



## Središnja medicinska knjižnica

**Zibar, Karin (2015) *Povezanost plazmatske koncentracije peptida 1 sličnog glukagonu i čimbenika rasta fibroblasta-21 s regulacijom glikemije, lipidemijom i mikrovaskularnim komplikacijama u bolesnika sa šećernom bolešću tipa 1 [The relationship of plasma concentrations of glucagone-like peptide 1 and fibroblast growth factor-21 with glucoregulation, lipidemia and microvascular complications in diabetes mellitus type 1 individuals]. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.***

<http://medlib.mef.hr/2227>

University of Zagreb Medical School Repository

<http://medlib.mef.hr/>

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET

**Karin Zibar**

**Povezanost plazmatske koncentracije  
peptida 1 sličnog glukagonu i  
čimbenika rasta fibroblasta-21 s  
regulacijom glikemije, lipidemijom i  
mikrovaskularnim komplikacijama u  
bolesnika sa šećernom bolešću tipa 1**

**DISERTACIJA**



**Zagreb, 2015.**

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET

**Karin Zibar**

**Povezanost plazmatske koncentracije  
peptida 1 sličnog glukagonu i  
čimbenika rasta fibroblasta-21 s  
regulacijom glikemije, lipidemijom i  
mikrovaskularnim komplikacijama u  
bolesnika sa šećernom bolešću tipa 1**

**DISERTACIJA**

Zagreb, 2015.

Disertacija je izrađena u Zavodu za endokrinologiju i bolesti metabolizma Sveučilišne klinike za dijabetes, endokrinologiju i bolesti metabolizma „Vuk Vrhovac“ te u Zavodu za kliničku kemiju i laboratorijsku medicinu Kliničke bolnice Merkur, Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu u okviru projekta Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa: Metabolički sindrom u šećernoj bolesti tipa 1, br. 045-1080230-0516.

Mentor: prof. dr. sc. Lea Smirčić-Duvnjak, dr. med., subspecijalist endokrinologije i dijabetologije

## **ZAHVALE**

Zahvaljujem svima koji su mi nesebično pomogli, podržavali me i hrabрили prilikom izrade doktorske disertacije.

## SADRŽAJ

POPIS OZNAKA I KRATICA.....	VIII
POPIS SLIKA .....	XI
POPIS TABLICA .....	XIII
1. UVOD – PREGLED DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA .....	1
1.1. Šećerna bolest tipa 1 .....	1
1.1.1. Regulacija glikemije i mikrovaskularne komplikacije u ŠBT1 .....	5
1.1.1.1. Inzulinska rezistencija u ŠBT1.....	7
1.2. Inkretini .....	9
1.2.1. Fiziologija GLP-1.....	10
1.2.2. GLP-1 u šećernoj bolesti tipa 2.....	12
1.2.3. Inzulinska rezistencija i GLP-1 .....	13
1.2.4. GLP-1 u šećernoj bolesti tipa 1 .....	14
1.3. Čimbenik rasta fibroblasta .....	16
1.3.1. Fiziologija FGF-21.....	17
1.3.2. Inzulinska rezistencija i FGF-21 .....	19
1.3.3. FGF-21 u šećernoj bolesti tipa 2 .....	21
1.3.4. FGF-21 u šećernoj bolesti tipa 1 .....	21
2. HIPOTEZA .....	23
3. CILJEVI .....	24
4. MATERIJALI I METODE .....	25
4.1. Ispitanici i kontrolna skupina .....	25
4.1.1. Veličina uzorka.....	27
4.2. Postupci.....	27
4.2.1. Mjerenje inzulinske rezistencije.....	28
4.2.2. ELISA (od eng. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) .....	28
4.2.2.1. Ukupni i aktivni GLP-1 .....	28
4.2.2.2. Glukagon .....	29
4.2.2.3. FGF-21 .....	31
4.2.3. Dijabetička nefropatija.....	32
4.2.4. Dijabetička retinopatija .....	32

4.2.5. Dijabetička neuropatija.....	34
4.3. Provedba istraživanja .....	36
4.4. Statistička raščlamba podataka .....	37
4.5. Etička načela .....	38
5. REZULTATI.....	39
5.1. Opća, klinička i laboratorijska obilježja ispitanika sa ŠBT1 .....	39
5.2. Opća, klinička i laboratorijska obilježja zdravih kontrolnih ispitanika....	49
5.3. Povezanost GLP-1 s regulacijom glikemije, lipidemijom i mikrovaskularnim komplikacijama u ispitanika sa ŠBT1 .....	51
5.3.1. GLP-1 u plazmi i regulacija glikemije .....	51
5.3.1.1. GLP-1 i regulacija glikemije s obzirom na spol.....	53
5.3.2. GLP-1 u plazmi i vrijednosti lipida .....	55
5.3.2.1. Razlike u lipidemiji s obzirom na medijan vrijednosti GLP-1 .	57
5.3.2.2. Razlike u GLP-1 s obzirom na medijane koncentracija obilježja lipidemije .....	58
5.3.3. GLP-1 u plazmi i mikrovaskularne komplikacije .....	61
5.3.3.1. Učestalost dijabetičke neuropatije s obzirom na podjelu ispitanika prema kvartilama vrijednosti GLP-1.....	64
5.4. Povezanost FGF-21 s regulacijom glikemije, lipidemijom i mikrovaskularnim komplikacijama u ispitanika sa ŠBT1 .....	65
5.4.1. FGF-21 u serumu i regulacija glikemije.....	65
5.4.1.1. FGF-21 i regulacija glikemije s obzirom na spol.....	68
5.4.2. FGF-21 u serumu i vrijednosti lipida .....	68
5.4.2.1. Razlike u lipidemiji s obzirom na medijan vrijednosti FGF-21	69
5.4.3. FGF-21 u serumu i mikrovaskularne komplikacije .....	70
5.4.3.1. FGF-21 i dijabetička polineuropatija s obzirom na inzulinsku osjetljivost prema eGDR.....	71
5.5. Međuodnos koncentracija GLP-1 i FGF-21 u plazmi u ispitanika sa ŠBT1 i u zdravih kontrolnih ispitanika .....	72
5.6. Povezanost koncentracija GLP-1 s inzulinskom rezistencijom (eGDR), MS, koncentracijom glukagona u plazmi te inzulinom u ispitanika sa ŠBT1.....	75
5.6.1. GLP-1 s obzirom na MS prema NCEP:ATPIII kriterijima .....	77
5.6.1.1. GLP-1 u binarnoj logističkoj regresiji s obzirom na MS u ispitanika sa ŠBT1.....	79

5.7. Povezanost koncentracija FGF-21 s inzulinskom rezistencijom (eGDR), MS, koncentracijom glukagona u plazmi te inzulinom u ispitanika sa ŠBT1 .....	80
5.7.1. eGDR s obzirom na kategorije vrijednosti FGF-21 .....	81
5.7.2. FGF-21 s obzirom na MS prema NCEP:ATPIII kriterijima .....	83
5.8. Analiza GLP-1 i FGF-21 s obzirom na prisutnost MS prema eGDR ....	84
5.8.1. MS, eGDR i kalorijska vrijednost doručka u ispitanika sa ŠBT1 ...	92
5.8.2. MS i eGDR s glikemijom, lipidemijom i mikrovaskularnim komplikacijama u ispitanika sa ŠBT1 .....	92
5.9. Usporedba GLP-1 u plazmi u ispitanika sa ŠBT1 i u zdravih kontrolnih ispitanika .....	93
5.9.1. GLP-1 u binarnoj logističkoj regresiji s obzirom na osnovnu skupinu ispitanika (ispitanici sa ŠBT1 i zdravi kontrolni ispitanici) .....	99
5.9.2. GLP-1 s obzirom na spol .....	100
5.10. Usporedba FGF-21 u plazmi u ispitanika sa ŠBT1 i u zdravih kontrolnih ispitanika .....	102
5.10.1. FGF-21 u binarnoj logističkoj regresiji s obzirom na osnovnu skupinu ispitanika (ispitanici sa ŠBT1 i zdravi kontrolni ispitanici)	105
5.10.2. FGF-21 s obzirom na spol .....	106
5.11. Ostalo .....	107
5.11.1. Povezanost GLP-1 i FGF-21 s regulacijom glikemije i s lipidemijom u zdravih kontrolnih ispitanika .....	107
5.11.2. Povezanost GLP-1 i FGF-21 s obilježjima bubrežne funkcije .....	107
5.11.3. Koncentracije GLP-1, FGF-21 i glukagona s kalorijskom vrijednosti doručka u ispitanika sa ŠBT1 .....	109
5.11.4. Odnos koncentracija GLP-1 i FGF-21 s protutjelima na gušteraču u ispitanika sa ŠBT1 .....	110
5.11.5. Povezanost GLP-1 i FGF-21 s dobi, trajanjem ŠBT1, ITM, OS i krvnim tlakom u ispitanika sa ŠBT1 .....	111
6. RASPRAVA .....	113
6.1. Povezanost GLP-1 s regulacijom glikemije, lipidemijom i mikrovaskularnim komplikacijama u ispitanika sa ŠBT1 .....	113
6.1.1. GLP-1 u plazmi i regulacija glikemije .....	113
6.1.2. GLP-1 u plazmi i vrijednosti lipida .....	114
6.1.3. GLP-1 u plazmi i mikrovaskularne komplikacije .....	115
6.2. Povezanost FGF-21 s regulacijom glikemije, lipidemijom i mikrovaskularnim komplikacijama u ispitanika sa ŠBT1 .....	116

6.2.1. FGF-21 u serumu i regulacija glikemije.....	116
6.2.2. FGF-21 u serumu i vrijednosti lipida .....	117
6.2.3. FGF-21 u serumu i mikrovaskularne komplikacije .....	117
6.3. Međuodnos koncentracija GLP-1 i FGF-21 u plazmi u ispitanika sa ŠBT1 i u zdravih kontrolnih ispitanika .....	119
6.4. Povezanost koncentracija GLP-1 s inzulinskom rezistencijom (eGDR), MS, koncentracijom glukagona u plazmi te inzulinom u ispitanika sa ŠBT1.....	119
6.5. Povezanost koncentracija FGF-21 s inzulinskom rezistencijom (eGDR), MS, koncentracijom glukagona u plazmi te inzulinom u ispitanika sa ŠBT1.....	121
6.6. Analiza GLP-1 i FGF-21 s obzirom na prisutnost MS prema eGDR ..	122
6.7. Usporedba GLP-1 u plazmi u ispitanika sa ŠBT1 i u zdravih kontrolnih ispitanika.....	124
6.8. Usporedba FGF-21 u serumu u ispitanika sa ŠBT1 i u zdravih kontrolnih ispitanika .....	128
6.9. Povezanost GLP-1 i FGF-21 s dobi, trajanjem ŠBT1, ITM, OS i krvnim tlakom u ispitanika sa ŠBT1 .....	131
6.10. Zaključak rasprave.....	131
7. ZAKLJUČCI.....	135
8. SAŽETAK .....	141
9. SUMMARY .....	143
10. POPIS LITERATURE .....	145
11. ŽIVOTOPIS .....	168



## POPIS OZNAKA I KRATICA

ACE-inhibitor	inhibitor angiotenzin konvertaze
AGE	napredni završni proizvodi glikacije (od eng. <i>advanced glycation end-products</i> )
aGLP-1	aktivni peptid 1 sličan glukagonu
ALFKG	laserska fotokoagulacija retine
ALT	alanin aminotransferaza
AST	aspartat aminotransferaza
cAMP	ciklički adenzin monofosfat (od eng. <i>cyclic adenosine monophosphate</i> )
ChgA	kromogranin A (od eng. <i>chromogranin A</i> )
ChREBP	vežuća bjelančevina koja odgovara na ugljikohidrate (od eng. <i>carbohydrate response element binding protein</i> )
CKD EPI formula	eng. <i>Chronic Kidney Disease Epidemiology</i> formula
CRP	C-reaktivni protein
Cut off vrijednost	rezna granična vrijednost
DCCT	eng. „ <i>The Diabetes Control and Complication Trial</i> “
DPN	dijabetička polineuropatija
DPP-IV	dipeptidil peptidaza-IV (od eng. <i>dipeptidyl peptidase-IV</i> )
eGDR formula	prosječna stopa raspoložive glukoze (od eng. <i>estimated glucose disposal rate</i> )
ELISA	eng. <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
FGF	čimbenik rasta fibroblasta (od eng. <i>fibroblast growth factor</i> )
FGF-15/19	čimbenik rasta fibroblasta-15/19
FGF-21	čimbenik rasta fibroblasta-21
FGF-23	čimbenik rasta fibroblasta-23
FGFR	receptor za čimbenik rasta fibroblasta
GAD65 protutijela	protutijela na dekarboksilazu glutaminske kiseline (od eng. <i>glutamic acid decarboxylase 65</i> protutijela)
GFAP	kiseli glijalni fibrilarni protein (od eng. <i>glial fibrillary protein</i> )
GGT	γ-glutamil transpeptidaza
GIP	insulintropni polipeptid ovisan o glukozu (od eng. <i>glucose-dependent insulintropic peptide</i> ili <i>gastric inhibitory polypeptide</i> )
GLP-1	peptid 1 sličan glukagonu (od eng. <i>glucagon-like peptide 1</i> )

GLP-1R	receptor za peptid 1 sličan glukagonu
GLUT1	prijenosnik glukoze 1 (od eng. <i>glucose transporter 1</i> )
GUP	glukoza u plazmi
HbA1c	glikirani hemoglobin (od eng. <i>glycated haemoglobin</i> )
HDL kolesterol	kolesterol visoke gustoće (od eng. <i>high density lipoprotein cholesterol</i> )
HLA	ljudski leukocitni antigen (od eng. <i>human leukocyte antigen</i> )
iGLP-1	inaktivni peptid 1 sličan glukagonu
IA	inkretinski analozi
IAA	protutijela na inzulin (od eng. <i>insulin autoantibody</i> )
IA-2 protutijela	protutijela protein 2 udružena s inzulinomom (od eng. <i>tyrosine phosphatase-related islet antigen 2</i> )
ICA69	protutijela na $\beta$ -stanicu gušterače (od eng. <i>islet cell antibodies</i> )
IDF	eng. <i>International Diabetes Federation</i>
iGLP-1	inaktivni peptid 1 sličan glukagonu
IGRP	protein povezan s glukoza-6-fosfataza katalitičkom jedinicom (od eng. <i>islet-specific glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related protein</i> )
IO	inzulinska osjetljivost
IOT	intraokularni tlak
IR	inzulinska rezistencija
ITM	indeks tjelesne mase
KBB	kronična bubrežna bolest
LDL kolesterol	kolesterol male gustoće (od eng. <i>low density lipoprotein cholesterol</i> )
mRNA	eng. messenger RNA
NCEP:ATP III kriteriji	eng. „ <i>National Cholesterol Education Program:Adult Treatment Panel III</i> “
NIS	neuropatski bodovni sustav (od eng. <i>Neuropathy Impairment Score</i> )
OB	opseg bokova
OGTT	oralni test opterećenja glukozom (od eng. <i>oral glucose tolerance test</i> )
OS	opseg struka
OS/OB	omjer opsega struka i bokova
Outlier	stršeća vrijednost
PPAR $\alpha$	aktivator- $\alpha$ peroksisomnog rastućeg receptora (od eng. <i>peroxisome proliferator-activated receptor alpha</i> )
PPAR $\gamma$	aktivator- $\gamma$ peroksisomnog rastućeg receptora (od eng. <i>peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i> )

MS	metabolički sindrom
ROC	eng. <i>receiver operating characteristics</i>
Skr	kreatinin u serumu
SMK	slobodne masne kiseline
SZO	Svjetska zdravstvena organizacija (eng. <i>World Health Organization</i> , WHO)
SŽB	srčanožilna bolest
ŠB	šećerna bolest
ŠBT1	šećerna bolest tipa 1
ŠBT2	šećerna bolest tipa 2
TM	tjelesna masa
uGLP-1	ukupni peptid 1 sličan glukagonu
VLDL kolesterol	kolesterol vrlo male gustoće (od eng. <i>very low density lipoprotein cholesterol</i> )
VO	vidna oštrina ( lat. <i>visus oculi</i> )
ZNT8	protutijela na prijenosnik cinka (od eng. <i>zinc transporter 8 antibody</i> )

## POPIS SLIKA

Slika 1. Metabolički učinci peptida 1 sličnog glukagonu (GLP-1).	11
Slika 2. Metabolički učinci čimbenika rasta fibroblasta-21 (FGF-21).	19
Slika 3. Učestalost dijabetičke nefropatije	42
Slika 4. Učestalost dijabetičke retinopatije	43
Slika 5. Učestalost dijabetičke neuropatije	44
Slika 6. Učestalost dijabetičke polineuropatije	45
Slika 7. Učestalost fokalne/multifokalne neuropatije	46
Slika 8. Učestalost mikrovaskularnih komplikacija	47
Slika 9. Povezanost bazalne koncentracije ukupnog peptida 1 sličnog glukagonu (uGLP-1 0') s glikemijom natašte	52
Slika 10. Razlika u bazalnoj koncentraciji aktivnog peptida 1 sličnog glukagonu (aGLP-1 u 0') između žena (n=14) s odličnom i lošijom regulacijom glikemije	54
Slika 11. Razlika bazalne koncentracije aktivnog peptida 1 sličnog glukagonu (aGLP-1 u 0') između muškaraca (n=16) s odličnom i lošijom regulacijom glikemije	55
Slika 12. Postprandijalne koncentracije i delta vrijednosti ukupnog i aktivnog peptida 1 sličnog glukagonu (uGLP-1 30', $\Delta$ uGLP-1, aGLP-1 30' i $\Delta$ aGLP-1) s obzirom na medijan ukupnog kolesterola	59
Slika 13. Postprandijalna koncentracija aktivnog peptida 1 sličnog glukagonu (aGLP-1 30') s obzirom na medijan koncentracije kolesterola visoke gustoće (HDL kolesterola)	60
Slika 14. Postprandijalne koncentracije i delta vrijednosti ukupnog i aktivnog peptida 1 sličnog glukagonu (uGLP-1 30', $\Delta$ uGLP-1, aGLP-1 30' i $\Delta$ aGLP-1) s obzirom na medijan kolesterola male gustoće (LDL kolesterola)	61
Slika 15. Bazalna koncentracija aktivnog peptida 1 sličnog glukagonu (aGLP-1 0') u 3 skupine dijabetičke neuropatije	64
Slika 16. Učestalost dijabetičke neuropatije s obzirom na podjelu ispitanika (N=30) prema kvartilama aktivnog peptida 1 sličnog glukagonu natašte (aGLP-1 0').	65
Slika 17. Povezanost bazalne koncentracije čimbenika rasta fibroblasta-21 (FGF-21 0') s glikiranim hemoglobinom (HbA1c) iskazanim u mmol/mol	67
Slika 18. Razlika u bazalnoj koncentraciji čimbenika rasta fibroblasta-21 (FGF-21 u 0') između muškaraca (n=16) s boljom i lošijom regulacijom glikemije	68
Slika 19. Postprandijalna koncentracija čimbenika rasta fibroblasta-21 (FGF-21 30') s obzirom na stupanj dijabetičke polineuropatije u osoba (n=15) s većom inzulinskom osjetljivošću prema prosječnoj stopi raspoložive glukoze (eGDR >8,8 mg/kg/min)	72
Slika 20. Raspodjela ispitanika sa šećernom bolesti tipa 1 (ŠBT1) s obzirom broj kriterija metaboličkog sindroma (MS).	78
Slika 21. Prosječna stopa raspoložive glukoze (eGDR) s obzirom na medijan bazalne vrijednosti čimbenika rasta fibroblasta-21 (FGF-21 u 0').	82

Slika 22. Prosječna stopa raspoložive glukoze (eGDR) s obzirom na kvartile bazalne vrijednosti čimbenika rasta fibroblasta-21 (FGF-21 0').....	83
Slika 23. Prisutnost metaboličkog sindroma (MS) na temelju NCEP:ATP III kriterija (eng. „ <i>National Cholesterol Education Program:Adult Treatment Panel III</i> “) u ispitanika sa šećernom bolesti tipa 1 .....	85
Slika 24. ROC (eng. <i>receiveng operating characteristics</i> ) analiza za vrijednost prosječne stope raspoložive glukoze (eGDR) u ovisnosti o postojanju metaboličkog sindroma (MS) prema NCEP:ATPIII (eng. „ <i>National Cholesterol Education Program:Adult Treatment Panel III</i> “) kriterijima u ispitanika sa šećernom bolesti tipa 1 .....	86
Slika 25. Podjela ispitanika sa šećernom bolesti tipa 1 s obzirom na postojanje metaboličkog sindroma (MS) prema kriteriju rezne granične vrijednosti prosječne stope raspoložive glukoze (eGDR) dobivene ROC (eng. <i>receiveng operating characteristics</i> ) analizom.....	87
Slika 26. Povezanost postprandijalne koncentracije peptida 1 sličnog glukagonu (uGLP-1 30') s dozom bolus inzulina u ispitanika sa šećernom bolesti tipa 1 s prosječnom stopom raspoložive glukoze (eGDR≤8,45 mg/kg/min). ....	88
Slika 27. Povezanost koncentracije delta ukupnog peptida 1 sličnog glukagonu ( $\Delta$ uGLP-1) s bolus inzulinom u ispitanika sa šećernom bolesti tipa 1 s prosječnom stopom raspoložive glukoze (eGDR≤8,45 mg/kg/min). ....	89
Slika 28. Povezanost koncentracije delta ukupnog peptida 1 sličnog glukagonu ( $\Delta$ uGLP-1) s bazalnim inzulinom u ispitanika sa šećernom bolesti tipa 1 s prosječnom stopom raspoložive glukoze (eGDR≤8,45 mg/kg/min).....	90
Slika 29. Povezanost postprandijalne koncentracije ukupnog peptida 1 sličnog glukagonu (uGLP-1 30') s kolesterolom male gustoće (LDL kolesterol) u ispitanika sa šećernom bolesti tipa 1 s prosječnom stopom raspoložive glukoze (eGDR>8,45 mg/kg/min). ....	91
Slika 30. Bazalna koncentracija ukupnog peptida 1 sličnoga glukagonu (uGLP-1 0') u ispitanika sa šećernom bolesti tipa 1 (ŠBT1) i zdravih kontrolnih ispitanika. ....	95
Slika 31. Bazalna koncentracija aktivnog peptida 1 sličnoga glukagonu (aGLP-1 0') u ispitanika sa šećernom bolesti tipa 1 (ŠBT1) i zdravih kontrolnih ispitanika. ....	96
Slika 32. Bazalne i postprandijalne koncentracije ukupnog peptida 1 sličnoga glukagonu (uGLP-1 u 0' i 30') u ispitanika sa šećernom bolesti tipa 1 (ŠBT1).....	97
Slika 33. Bazalne i postprandijalne koncentracije aktivnog peptida 1 sličnoga glukagonu (aGLP-1 u 0' i 30') u ispitanika sa šećernom bolesti tipa 1 (ŠBT1) .....	98
Slika 34. Linearna regresija između delta ukupnog peptida 1 sličnog glukagonu i aktivnog peptida 1 sličnog glukagonu ( $\Delta$ uGLP-1 i $\Delta$ aGLP-1) u zdravih kontrolnih ispitanika .....	99
Slika 35. Bazalna koncentracija čimbenika rasta fibroblasta-21 (FGF-21 0') u ispitanika sa šećernom bolesti tipa 1 (ŠBT1) i zdravih kontrolnih ispitanika .....	104
Slika 36. Bazalna i postprandijalna koncentracija čimbenika rasta fibroblasta-21 (FGF-21 u 0' i 30') u zdravih kontrolnih ispitanika.....	105
Slika 37. Broj pozitivnih protutijela na gušteraču u ispitanika sa šećernom bolesti tipa 1 .....	110

## POPIS TABLICA

Tablica 1. Kriteriji za postavljanje dijagnoze šećerne bolesti.....	4
Tablica 2. Najučestalija protutijela na otočiće gušterače u osoba sa ŠBT1 .....	4
Tablica 3. Opća i klinička obilježja 30 ispitanika sa šećernom bolešću tipa 1. ....	40
Tablica 4. Laboratorijska obilježja 30 ispitanika sa šećernom bolešću tipa 1.....	48
Tablica 5. Opća, klinička i laboratorijska obilježja 10 zdravih kontrolnih ispitanika. ....	50
Tablica 6. Povezanost peptida 1 sličnog glukagonu (GLP-1) s regulacijom glikemije u ispitanika sa šećernom bolesti tipa 1 (ŠBT1). ....	51
Tablica 7. Multipla linearna regresija standardizirana za dob, ITM i trajanje ŠB odnosa zavisne varijable uGLP-1 0' i glikemije natašte. ....	53
Tablica 8. Povezanost peptida 1 sličnog glukagonu s lipidemijom u ispitanika sa šećernom bolesti tipa 1 .....	56
Tablica 9. Multipla linearna regresija standardizirana za dob, trajanje ŠBT1 i uzimanje statina odnosa zavisne varijable uGLP-1 30' i ukupnog kolesterola. ....	57
Tablica 10. Peptid 1 sličan glukagonu u ispitanika sa šećernom bolesti tipa 1 s obzirom na postojanje dijabetičke nefropatije. ....	61
Tablica 11. Peptid 1 sličan glukagonu u ispitanika sa šećernom bolesti tipa 1 s obzirom na postojanje dijabetičke retinopatije. ....	62
Tablica 12. Peptid 1 sličan glukagonu u ispitanika sa šećernom bolesti tipa 1 s obzirom na postojanje dijabetičke neuropatije. ....	63
Tablica 13. Povezanost čimbenika rasta fibroblasta-21 (FGF-21) s regulacijom glikemije u ispitanika sa šećernom bolesti tipa 1 (ŠBT1). ....	66
Tablica 14. Multipla linearna regresija standardizirana za dob, odnosa zavisne varijable uFGF-21 0' i glikiranog hemoglobina iskazanog u mmol/mol.....	67
Tablica 15. Povezanost čimbenika rasta fibroblasta-21 s lipidemijom u ispitanika sa šećernom bolesti tipa 1. ....	69
Tablica 16. Čimbenik rasta fibroblasta-21 u ispitanika sa šećernom bolesti tipa 1 s obzirom na postojanje dijabetičke nefropatije. ....	70
Tablica 17. Čimbenik rasta fibroblasta-21 u ispitanika sa šećernom bolesti tipa 1 s obzirom na postojanje dijabetičke retinopatije. ....	70
Tablica 18. Čimbenik rasta fibroblasta-21 u ispitanika sa šećernom bolesti tipa 1 s obzirom na postojanje dijabetičke neuropatije. ....	71
Tablica 19. Povezanost peptida 1 sličnog glukagonu i čimbenika rasta fibroblasta-21 u plazmi u ispitanika sa šećernom bolesti tipa 1. ....	73
Tablica 20. Povezanost peptida 1 sličnog glukagonu i čimbenika rasta fibroblasta-21 u plazmi u zdravih kontrola. ....	74
Tablica 21. Povezanost peptida 1 sličnog glukagonu (GLP-1) i čimbenika rasta fibroblasta-21 (FGF-21) u plazmi u ispitanika sa šećernom bolesti tipa 1 (ŠBT1) s obzirom na spol. ....	74

Tablica 22. Povezanost koncentracija peptida 1 sličnog glukagonu (GLP-1) u plazmi s inzulinskom rezistencijom (eGDR), koncentracijom glukagona u plazmi te dnevnom dozom inzulina u ispitanika sa šećernom bolešću tipa 1 (ŠBT1) .....	76
Tablica 23. Povezanost koncentracija peptida 1 sličnog glukagonu u plazmi s MS prema NCEP:ATPIII kriterijima.....	77
Tablica 24. Koncentracije GLP-1 te eGDR s obzirom na broj kriterija MS (1-3 kriterija: ŠBT1, OS, dislipidemija, povišen krvni tlak).....	79
Tablica 25. Binarna logistička regresija GLP-1 s obzirom na MS u osoba sa ŠBT1. ....	79
Tablica 26. Povezanost koncentracija čimbenika rasta fibroblasta-21 (FGF-21) u serumu s inzulinskom rezistencijom (eGDR), koncentracijom glukagona u plazmi te dnevnom dozom inzulina u ispitanika sa šećernom bolešću tipa 1 (ŠBT1) .....	80
Tablica 27. Povezanost koncentracija čimbenika rasta fibroblasta-21 u serumu s MS prema NCEP:ATPIII kriterijima.....	83
Tablica 28. Koncentracije FGF-21 s obzirom na broj kriterija MS (1-3 kriterija: ŠBT1, OS, dislipidemija, povišen krvni tlak).....	84
Tablica 29. Razlike u plazmatskim koncentracijama GLP-1 između ispitanika sa šećernom bolesti tipa 1 (ŠBT1) i zdravih kontrolnih ispitanika (Mann-Whitneyev test) i razlike između bazalnih i postprandijalnih vrijednosti navedenih hormona (Wilcoxonov test).....	94
Tablica 30. Binarna logistička regresija GLP-1 s obzirom na osnovnu skupinu ispitanika (ispitanici sa ŠBT1 i zdravi kontrolni ispitanici). ....	100
Tablica 31. Koncentracije GLP-1 s obzirom na spol.....	101
Tablica 32. Binarna logistička regresija za GLP-1 s obzirom na spol u ispitanika sa ŠBT1. ....	101
Tablica 33. Razlike u plazmatskim koncentracijama FGF-21 između ispitanika sa šećernom bolesti tipa 1 (ŠBT1) i zdravih kontrolnih ispitanika (Mann-Whitneyev test) i razlike između bazalnih i postprandijalnih vrijednosti navedenih hormona (Wilcoxonov test).....	103
Tablica 34. Binarna logistička regresija FGF-21 s obzirom na osnovnu skupinu ispitanika (ispitanici sa ŠBT1 i zdravi kontrolni ispitanici).....	106
Tablica 35. Koncentracije FGF-21 s obzirom na spol.....	106
Tablica 36. Binarna logistička regresija za FGF-21 s obzirom na spol u ispitanika sa ŠBT1. ....	107
Tablica 37. Povezanost peptida 1 sličnog glukagonu (GLP-1) i čimbenika rasta fibroblasta-21 (FGF-21) s obilježjima bubrežne funkcije u ispitanika sa šećernom bolesti tipa 1 (ŠBT1).....	108
Tablica 38. Multipla linearna regresija standardizirana za ITM, odnosa zavisne varijable uGLP-1 30' i kreatinina.....	109
Tablica 39. Povezanost koncentracija peptida 1 sličnog glukagonu i čimbenika rasta fibroblasta-21 u plazmi s dobi, trajanjem šećerne bolesti, indeksom tjelesne mase, opsegom struka i krvnim tlakom.....	111

## 1. UVOD – PREGLED DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA

### 1.1. Šećerna bolest tipa 1

Šećerna bolest tipa 1 (ŠBT1), prethodno zvana inzulin ovisna šećerna bolest (ŠB), obuhvaća 5-10% ukupno oboljelih od ŠB. Prevalencija ŠBT1 je u stalnom porastu. U Republici Hrvatskoj oko 9,2% odrasle populacije ima ŠB, od čega oko 7% čini ŠBT1 (podaci prema CroDiab registru, CEZIH-u te procjenama Svjetske Dijabetološke Federacije 2011. godine). Dijeli se na imunoposredovanu ŠBT1 (najčešći tip A) te idiopatsku ŠBT1 (tip B). Dijagnoza ŠB se postavlja pomoću općeprihvaćenih dijagnostičkih kriterija Svjetske zdravstvene organizacije (SZO) (WHO, od eng. *World Health Organization*) i Međunarodne federacije za dijabetes (IDF, od eng. *International Diabetes Federation*) na temelju oralnog testa opterećenja glukozom (OGTT, od eng. *oral glucose tolerance test*) (1). 2006. godine su izašle obnovljene smjernice za dijagnozu ŠB koje su 2011. godine dobile dodatak (Tablica 1.), gdje se osim OGTT po prvi put u kriterije za dijagnozu ŠB uključuje i vrijednost glikiranog hemoglobina (hemoglobin A1c, HbA1c, od eng. *glycated haemoglobin*) (2). Međutim, vrijednost HbA1c sama za sebe bez OGTT nije dovoljan kriterij za dijagnozu ŠB. Važno je naglasiti da OGTT i vrijednost HbA1c treba još jednom ponoviti prije postavljanja dijagnoze ŠB, jer je prevalencija ŠB značajno manja kada se dijagnoza postavlja na temelju 2 patološka nalaza (3).

ŠBT1 (tip A) je obilježena poremećenom funkcijom  $\beta$ -stanica gušterače posljedično autoimunom razaranju posredovanom limfocitima T. Najveći predskazatelji ŠBT1 su prisustvo i broj protutijela na gušteraču, od kojih se neka mogu naći i prije postavljanja dijagnoze ŠBT1 (4). Prilikom dijagnoze ŠBT1 te tijekom prve godine ostatna  $\beta$ -stanična funkcija očuvanih otočića gušterače iznosi skoro 100%, no nakon 5-10 godina trajanja ŠBT1 pada na oko 15% (5, 6). Na raskrižju hormonskih i imunskih putova u ŠBT1 središnju ulogu ima inzulin. Inzulin je ključni anabolički hormon u metabolizmu glukoze koji nedostaje u ovoj bolesti, a u isto vrijeme je i jedan od ključnih antigena koji su meta autoreaktivnim limfocitima T koje razaraju gušteraču. Tek je 1965. godine



Gepts (7) utvrdio da je upala otočića gušterače glavno obilježje bolesti te da je ŠBT1 autoimuna bolest. Deset godina nakon toga je Bottazo otkrio prva protutijela na otočiće gušterače (8). Do današnjih dana otkrivena protutijela koja mogu biti prisutna u ŠBT1 su prikazana u Tablici 2.: protutijela na endogeni inzulin (IAA, od eng. *insulin autoantibody*), protutijela na dekarboksilazu glutaminske kiseline (GAD65, od eng. *glutamic acid decarboxylase*), protutijela protein 2 udružena s inzulinomom (IA-2, od eng. *insulinoma-associated protein 2* ili ICA512), podskupina protutijela na  $\beta$ -stanicu gušterače (ICA69, od eng. *islet cell autoantibody*) te protutijela na prijenosnik cinka (ZNT8, od eng. *zinc transporter 8 antibody*). Prisustvo ICA69 protutijela s GAD65 i IA-2 protutijelima u prvih rođaka osoba sa ŠBT1 dovodi do brže progresije kliničke slike ŠBT1 u odnosu na odsustvo ICA69 (4). Nema specifičnog obrasca kojim redoslijedom se pojavljuju protutijela u ŠBT1, iako se IAA pojavljuju većinom prva, te su nerijetko odsutna u odraslih, a GAD65, IA-2 i ZNT8 se pojavljuju u otprilike slično vrijeme. Protutijela na ZnT8, GAD65, IA-2 ili IAA su prisutna u početku ŠBT1 u više od 90% osoba, variraju ovisno o dobi i etničkoj pripadnosti (9). Niti jedno protutijelo samo za sebe nije dovoljno prediktivno za ŠBT1, a što je veći broj pozitivnih protutijela, to se povećava pozitivna prediktivna vrijednost za ŠBT1 (10-12). Nakon što imuni proces uništi  $\beta$ -stanicu gušterače, otočići atrofiraju, a imunosni biljezi nestaju. Paralelno s tim mogu s vremenom i nestati navedena protutijela na gušteraču. Međutim, postoje osobe koje više nemaju antigene, ali i dalje imaju prisutna protutijela na gušteraču. To je specifično za protutijelo GAD65 te se objašnjava individualnim obrascem aktivnosti protutijela.

U novije je vrijeme otkriven nemali broj novih vlastitih antigena povezanih sa ŠBT1. Neki od njih su protein povezan s glukoza-6-fosfataza katalitičkom jedinicom koja je specifična za otočiće (IGRP, od eng. *islet-specific glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related protein*) (13), kromogranin A (ChgA, od eng. *chromogranin A*) (14), „heat shock“ proteini, jun-B, 16 i CD38 antigeni (15), kiseli glijalni fibrilarni protein (GFAP, od eng. *glial fibrillary protein*) (16) te periferin koji ima izražaj u raznim endokrinim tkivima. Periferin bio mogao u skoroj budućnosti svrgnuti hipotezu da je autoimuno događanje prisutno samo

na  $\beta$ -stanicama gušterače u ŠBT1. Pretpostavlja da su neuronalni elementi molekularna meta za imunosno posredovanu ozljedu u raznim oblicima endokrine autoimunosti, uključujući ŠBT1 (17). Osim protutijela GAD65, većina drugih protutijela je regulirana na biosintetičkoj razini (kada je povećana metabolička potreba povećat će se i proizvodnja vlastitih antigena). Za sada, na temelju svega još uvijek nije razjašnjeno jesu li vlastiti antigeni okidač za autoimuni proces ili samo kolateralna šteta koja je dio već postojećega, zadanog imunosnog procesa razaranja  $\beta$ -stanica u ŠBT1 (18).

Geni HLA (ljudski leukocitni antigen, od eng. *human leukocyte antigen*), odnosno molekule II razreda sustava HLA dokazuju najveći genetički stupanj povezanosti sa ŠBT1. Pojedinci s visoko rizičnim HLA-DR3-DQ2/DR4-DQ8 genotipom imaju 20 puta veći rizik za razvoj ŠBT1 u usporedbi s općom populacijom. Prisustvo navedenog visokorizičnog genotipa čini 30-50% genskog rizika za razvoj ŠBT1 (19). Haplotipovi DQA1\*0501-DQB1\*0302 i DQA1\*0501-DQB1\*0201 se u našoj populaciji nalaze u više od 50% osoba sa ŠBT1 u odnosu na 10% u općoj populaciji. Razni su drugi geni u II, a i u I razredu HLA sustava te ne-HLA sustava rizični za razvoj ŠBT1, ali u manjem postotku od navedenog genotipa. Pojedini haplotipovi imaju zaštitnu ulogu, kao što je HLA DQB1\*0602, prisutan je u 20% opće populacije te u samo 1% osoba sa ŠBT1 (20). Sve više se posljednjih godina istražuju različiti okolišni rizični čimbenici. Postoje razne pretpostavke o tome koji okolišni čimbenici doprinose razvoju ŠBT1 (prehrambeni čimbenici i hipoteza „ubrzavanja“, u kojem inzulinska rezistencija (IR) i pretilost u djetinjstvu igraju ključnu ulogu), ali njihovi utjecaji nisu još do kraja potvrđeni (21). Smatra se da svake godine raste prevalencija ŠBT1 zbog još neotkrivenih okolišnih čimbenika. Zaključno, ŠBT1 je složena poligenska autoimuna bolest, u kojoj protutijela na gušteraču, metaboličke promjene, genski te okolišni čimbenici imaju zajedničku ulogu u njezinom razvoju (4).

Tablica 1. Kriteriji za postavljanje dijagnoze šećerne bolesti

Stanje i varijable	Vrijednost varijable
<b>Šećerna bolest</b>	
Glukoza natašte	≥7 mmol/l
	ili
Glukoza 120' iza jela *	≥11,1 mmol/l
HbA1c <sup>†</sup>	≥6,5%
<b>Predijabetes</b>	
<u>Poremećena tolerancija glukoze</u>	
Glukoza natašte	<7 mmol/l
	i
Glukoza 120' iza jela *	≥7,8 mmol/l i <11,1 mmol/l
HbA1c <sup>†</sup>	5,7-6,4%
<u>Poremećena tolerancija glukoze natašte</u>	
Glukoza natašte	6,1-6,9 mmol/l
	i
Glukoza 120' iza jela *	<7,8 mmol/l
HbA1c <sup>†</sup>	5,7-6,4%
<b>Normalan nalaz</b>	
Glukoza natašte	<5,6 mmol/l
Glukoza 120' iza jela *	<7,7 mmol/l
HbA1c <sup>†</sup>	<5,7%

\*vrijednost venske glukoze u plazmi 2 sata nakon opterećenja sa 75 grama glukoze; <sup>†</sup>HbA1c- glikirani hemoglobin. Preoblikovano prema „WHO recommendations for the diagnostic criteria for diabetes and intermediate hyperglycaemia“ 2006 i „Use of Glycated Haemoglobin (HbA1c) in the Diagnosis of Diabetes Mellitus“ 2011, Geneva, World Health Organization.

Tablica 2. Najučestalija protutijela na otočiće gušterače u osoba sa ŠBT1

Kratika	Puno ime na engleskome	Puno ime na hrvatskome	Obilježja
IAA	<i>insulin autoantibody</i>	protutijela na endogeni inzulin	Otkrivena 1983. godine (22), pojavljuju se u ranom stupnju bolesti, puno prije pojave kliničke slike ŠBT1 te njihovo

			prisustvo obrnuto korelira s dobi (81% bolesnika ima pozitivna protutijela prije 10. godine, a 61% između 10. i 20. godine).
<b>GAD65</b>	<i>glutamic acid decarboxylase</i>	protutijela na dekarboksilazu glutaminske kiseline	Prisutna u 80% osoba prigodom postavljanja dijagnoze ŠBT1, a nalaze se na citosolnoj strani membrane sekretornih mjehurića u $\beta$ -stanici (23).
<b>IA-2</b>	<i>insulinoma-associated protein 2</i> ili ICA512	protutijela protein 2 udružena s inzulinomom	Protutijela na protein fosfotirozin fosfatazu na membrani sekretornih zrnaca u $\beta$ -stanici, prigodom postavljanja dijagnoze prisutna u oko 58% osoba (24-26).
<b>ICA69</b>	<i>islet cell autoantibody</i>	podskupina protutijela na $\beta$ -stanicu gušterače, odnosno protutijela na antigen 69	Nalaze se na membrani sekretornih zrnaca u $\beta$ -stanici, prethodno zvana „non-GAD reactive“, 85% osoba prigodom postavljanja dijagnoze ŠBT1 ima prisutna ova protutijela (4).
<b>ZNT8</b>	<i>zinc transporter 8 antibody</i>	protutijela na prijenosnik cinka	Nalaze se na membrani sekretornih zrnaca u $\beta$ -stanici, prisutna su u velikom postotku prigodom postavljanja dijagnoze ŠBT1 (27).

\*ŠBT1- šećerna bolest tipa 1

### 1.1.1. Regulacija glikemije i mikrovaskularne komplikacije u ŠBT1

U osoba sa ŠBT1 glavni cilj liječenja je zadovoljavajuća regulacija glikemije i prevencija ili usporavanje nastanka mikrovaskularnih i makrovaskularnih komplikacija (28). Glavni uzrok smrti u osoba sa ŠBT1, uz srčanožilnu bolest (SŽB), čine mikrovaskularne komplikacije, među kojima je prvi uzrok bubrežna bolest (29). Mikrovaskularne komplikacije čine dijabetička nefropatija, dijabetička retinopatija te dijabetička neuropatija. Poznato je da prisustvo dijabetičke retinopatije u osoba sa ŠBT1 povećava oko četiri puta rizik smrti u odnosu na osobe bez retinopatije (30). Istraživanje „The Diabetes Control and Complication Trial (DCCT)“ je utvrdilo izravnu vezu između regulacije glikemije, mjerenu pomoću HbA1c, s početkom nastanka mikrovaskularnih komplikacija

(31, 32). Dislipidemija je također povezana s povišenim rizikom razvoja mikrovaskularnih komplikacija (33-35). Smanjenje HbA1c za 2% smanjuje incidenciju dijabetičke nefropatije za 54%, a dijabetičke retinopatije za 76% (36). Postoji čvrsta povezanost između vrijednosti HbA1c s bazalnim i postprandijalnim koncentracijama glukoze u krvi (37, 38), kao i između postprandijalne hiperglikemije s razvojem mikrovaskularnih komplikacija (39, 40). Smanjenje varijabilnosti postprandijalne hiperglikemije je jedan od ključnih koraka u smanjenju nastanka dijabetičkih komplikacija (41). Postprandijalna glikemija ovisi o nekoliko čimbenika: apsorpciji glukoze, lučenju različitih hormona (inzulin, glukagon, amilin, inkretini) i njihovom učinku na jetreni metabolizam glukoze te metabolizam glukoze u perifernim tkivima.  $\beta$ -stanica gušterače posjeduje ulogu metaboličkog čvorišta u tijelu, gdje se povezuje endokrini sustav s hranidbenim metabolizmom. Iako je povećanje koncentracije unutarstaničnog kalcija glavni signal za lučenje inzulina, mehanizmi ovisni o cAMP-u (ciklički adenzin monofosfat, od eng. *cyclic adenosine monophosphate*) imaju ne manje važnu ulogu u lučenju inzulina (42). Istraživanja su pokazala da je različito postprandijalno lučenje inzulina, glukagona i glukoze između osoba sa i bez ŠB. U osoba bez ŠB postprandijalni porast glukoze i inzulina u krvi rezultira smanjenjem glikogenolize i glukoneogeneze u jetri i povišenjem unosa glukoze i iskorištavanjem glukoze u perifernim tkivima, najviše mišićima i masnom tkivu (43). U osoba sa ŠB smanjeno lučenje inzulina te paradoksalni porast glukagona doprinose postprandijalnoj hiperglikemiji (44). Brzina pražnjenja želuca je također važan čimbenik regulacije postprandijalne glikemije. Puno je kontraverznih istraživanja o brzini pražnjenja želuca u osoba sa ŠBT1 (45-47). Ono što je dokazano je da akutna hiperglikemija usporava pražnjenje želuca i u osoba sa ŠBT1 i u zdravih (48, 49). Poznato je da osobe s autonomnom neuropatijom i dugogodišnjom ŠB imaju gastroparezu (50).

Unatoč sve boljoj regulaciji glikemije posljednjih desetljeća i dalje je velika učestalost razvoja mikrovaskularnih komplikacija u ŠBT1 te još uvijek tragamo za unaprjeđenjem dijagnostike otkrićem novih biljega njihovog razvoja. Terapija inzulinom je za sada još uvijek osnovna terapija liječenja ŠBT1. Glavni cilj

liječenja ŠBT1 je smanjenje HbA1c bez rizika od hipoglikemija i velikog dobitka na tjelesnoj masi (TM). Unatoč inzulinskoj terapiji često je teško postići euglikemiju u osoba sa ŠBT1, te se nerijetko susrećemo s hipoglikemijom te neželjenim dobitkom na TM koji mogu negativno utjecati na lipidne parametre, krvni tlak i prihvaćanje terapije od strane bolesnika. Novi pristup liječenja ŠB navodi da je homeostaza glukoze ovisna o zajedničkom djelovanju različitih hormona uz inzulin koji zajedno doprinose boljoj regulaciji glikemije, uz manje neželjenih nuspojava.

#### 1.1.1.1. Inzulinska rezistencija u ŠBT1

Dokazano je da IR ima važnu patofiziološku ulogu u nastanku ŠBT1 (nazvano „dvostruki dijabetes“) (51-54). Novija istraživanja dokazala su da je IR neovisni rizični čimbenik razvoja mikrovaskularnih komplikacija u ŠBT1 (55-60), čija je prevalencija do 30%. Prvi put je IR u ŠBT1 opisao Himsworth 1936. godine kada je uvidio razlike u ukupnoj dnevnoj dozi inzulina potrebnoj da se uspostavi euglikemija (61). Mehanizam nastanka IR u ŠBT1 vrlo je složen te nedovoljno do sada istražen. Dio mehanizama istovjetan je onima u ŠB tipa 2 (ŠBT2). Dokazano je da IR i s njom usko vezani rizični čimbenici nose veći rizik razvoja srčanožilnih komplikacija u ŠBT1 od same regulacije glikemije (62). Varijabilnost HbA1c je povezana s IR, a time i s nastankom mikrovaskularnih komplikacija (63). Pojedine osobe imaju IR u jetri i mišićnim stanicama unatoč dobroj regulaciji glikemije. Skeletni mišići igraju glavnu ulogu u IR, jer su odgovorni za 80% potaknutog unosa glukoze ovisnoga o inzulinu (64). Sama IR doprinosi razvoju ŠBT1 neovisno o drugim važnim rizičnim čimbenicima, kao što su broj pozitivnih protutijela na gušteraču te genski rizični čimbenici. Dokazano je da stanje koje obilježava IR (smanjeno lučenje inzulina nakon unosa šećera koje dovodi do posljedično odgođenog lučenja inzulina iz  $\beta$ -stanice gušterače) može upućivati na smanjenu funkciju  $\beta$ -stanice gušterače već u ranijoj fazi ŠBT1 (65).  $\beta$ -stanica gušterače u stanju IR pojačano izražava vlastite antigene te pogoduje autoimunim procesima, a navedeni procesi mogu dodatno pojačati autoimuno razaranje  $\beta$ -stanice gušterače te rezultirati bržem napredovanju ŠBT1 (66).

IR je temeljni patofiziološki čimbenik metaboličkog sindroma (MS), a učestalost MS i trajanje bolesti su predskazatelji kroničnih komplikacija u ŠBT1 (67). Učestalost MS u osoba sa ŠBT1 kreće se i do 40% (55, 68, 69). Glavna obilježja MS su IR, središnja pretilost, hipertrigliceridemija, sniženi kolesterol visoke gustoće (HDL, od eng. *high density lipoprotein*), hiperglikemija te povišen krvni tlak (70). Razlika u incidenciji MS u osoba sa ŠBT1 ovisi o kriterijima prema kojima se MS definira. Postoji više definicija MS, međutim, u kliničkoj praksi je općeprihvaćena definicija ona prema kriterijima NCEP:ATP III (prema eng. „*National Cholesterol Education Program:Adult Treatment Panel III*“) iz 2005. godine koja ne obuhvaća podatke o IR (71). Mjera opsega struka (OS) je važan dijagnostički kriterij MS, ali unatoč tomu postoje osobe s normalnom TM koje imaju IR (72). IR korelira s visceralnim masnim tkivom, koje je za razliku od subkutanog tkiva metabolički aktivan organ. To objašnjava činjenicu zašto IR ne mora biti prisutna u svih pretilih osoba. Samim mjerenjem OS ne možemo razlikovati o kojoj vrsti masnog tkiva se radi, a dijagnoza MS ne razlikuje visceralno masno tkivo od supkutanog. IR i visceralna pretilost su podjednako važni čimbenici u patogenezi MS (73).

Jedan od problema s kojim se susrećemo kada želimo procijeniti IR u osoba sa ŠBT1 je kako izračunati IR, jer formule na kojima se zasniva računanje IR u osoba sa ŠBT2 nisu primjenjive u ŠBT1, jer bolesnici nisu u mogućnosti proizvoditi vlastiti inzulin. Sljedeći problem je što je euglikemijski hiperinzulinemijski klamp test, zlatni standard dijagnoze IR u ŠBT1 (74), previše invazivan i skup postupak koji zahtijeva previše vremena za provođenje. Budući da je taj test teško izvediv u osoba sa ŠBT1, pokušalo se na temelju kliničkih obilježja IR (hiperinzulinemija, intolerancija glukoze, hipertrigliceridemija, snižen HDL kolesterol, povišen krvni tlak, povišen OS, povišen kolesterol niske gustoće- LDL, od eng. *low density lipoprotein*) otkriti koji su od tih parametara najjače povezani s IR u osoba sa ŠBT1 te na temelju njih stvoriti formulu za izračun IR. Zanimljivo je da HDL kolesterol i trigliceridi, inače ključne sastavnice IR, nisu značajno pridonijele IR u osoba sa ŠBT1. Najbolji klinički predskazatelji IR u ŠBT1 su povišen omjer struka i bokova (OS/OB), povišen krvni tlak, obiteljska anamneza ŠBT2 i HbA1c, te je na temelju njih napravljena formula za

izračunavanje IR u ŠBT1, a zove se eGDR (prosječna stopa raspoložive glukoze, od *eng. estimated glucose disposal rate*). Uključuje OS/OB, prisutnost povišenog krvnog tlaka i vrijednost HbA1c. eGDR je indeks koji korelira s euglikemijskim hiperinzulinemijskim klamp testom, te je mjera inzulinske osjetljivosti (IO). Izračunava se prema formuli:  $24,31 - 12,2 \times \text{OS/OB} - 3,29 \times \text{krvni tlak} - 0,57 \times \text{HbA1c}$ . Uključuje vrijednost krvnog tlaka  $>140/90$  mmHg ili uzimanje antihipertenzivne terapije, a izražava se kao 0-ne ili 1-da. Vrijednost eGDR obrnuto korelira s IR (75). Ne postoji točno određena granična vrijednost eGDR koja upućuje na postojanje IR, odnosno MS. Prema istraživanju Chillaróna 2009. godine, vrijednost eGDR ispod 8,77 mg/kg/min je pokazala 100% osjetljivost te 85,2% specifičnost za prisustvo MS u osoba sa ŠBT1. Chillarón je pokazao da postoji izravna povezanost između prisutnosti broja sastavnica MS s prevalencijom mikrovaskularnih komplikacija (76). Zaključno, mjerenje eGDR omogućuje bolje otkrivanje pojedinaca sa ŠBT1 koji imaju IR, odnosno MS, te nose veći rizik razvoja mikrovaskularnih komplikacija.

## 1.2. Inkretini

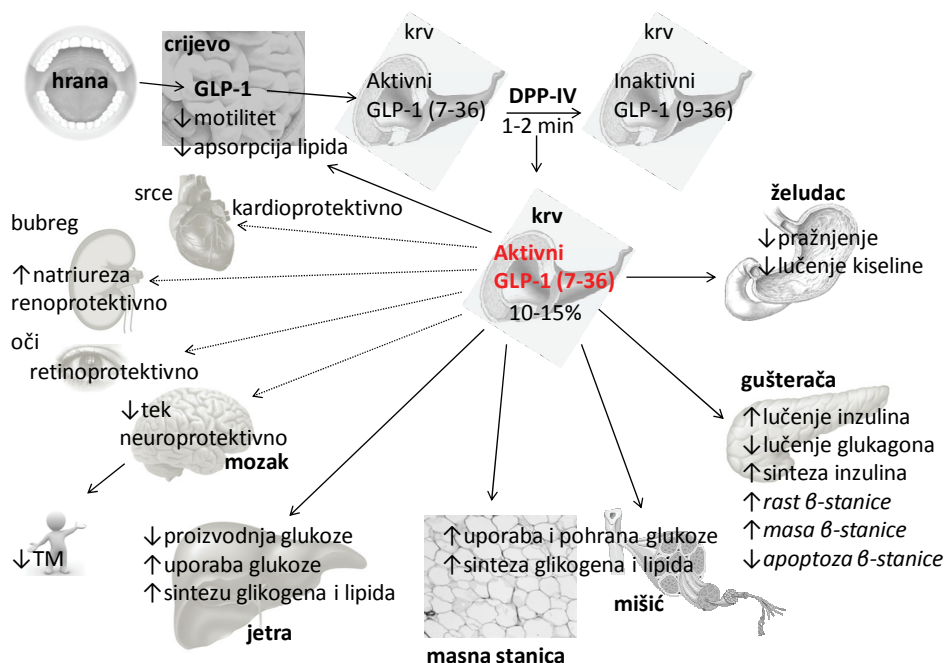
Prvi crijevni hormon „sekretin“ otkrili su 1902. godine Bayliss i Starling te su pretpostavljali da je uključen u metabolizam glukoze (77). La Barre je 1930. godine podijelio taj crijevni hormon u dvije frakcije: prva potiče egzokrino lučenje gušterače (sekretin) te druga smanjuje lučenje glukoze (inkretin). Od 1932. godine je općeprihvaćen naziv „inkretin“ (od *eng. „intestinal secretion of insulin“*) (78). Inkretini čine „veliku glukagonsku obitelj peptidnih hormona“, od kojih više od 90% fizioloških učinaka obavljaju 2 probavna hormona: insulinotropni polipeptid ovisan o glukozu (GIP, od *eng. glucose-dependent insulinotropic peptide* ili *gastric inhibitory polypeptide*) i peptid 1 sličan glukagonu (GLP-1, od *eng. glucagon-like peptide 1*) (79). Oba imaju ulogu u fiziologiji metabolizma glukoze, no ovdje ću se osvrnuti na ulogu GLP-1. Osim tradicijskih rizičnih čimbenika na glikemiju i lipidemiju u ŠB utječe i „inkretinski učinak“ koji označava jače lučenje inzulina oralnim (60-70%) u odnosu na intravenski unos glukoze (79-82).



### 1.2.1. Fiziologija GLP-1

GLP-1 je polipeptid sastavljen od 30 aminokiselina kojega luče neurohormonske L stanice distalnog dijela tankog crijeva, i manjim dijelom debelo crijevo, kao odgovor na unos masti, bjelančevina i šećera (83-86). Nastaje posttranslacijskim cijepanjem proglukagona. Kada se izluči u krv veže se za receptore povezane s G-bjelančevinom na ciljnim tkivima (GLP-1R):  $\alpha$  i  $\beta$  stanicama gušterače, središnjem i perifernom živčanom sustavu, srcu, endotelu, limfocitima, očima, bubrežima, plućima, probavnom sustavu, skeletnim mišićima, masnom tkivu i jetri (82). Ima višestruke fiziološke učinke (Slika 1.): potiče lučenje inzulina ovisno o glukozi, smanjuje lučenje glukagona ovisno o glukozi, usporava pražnjenje želuca, pokretljivost crijeva i lučenje želučane kiseline, smanjujući tek dovodi do gubitka na TM te potiče proliferaciju i povećava masu  $\beta$ -stanica u životinjskim modelima (79, 87-90). Također potiče proizvodnju inzulina povećanim prijelazom inzulinskog gena (91). U  $\beta$ -staničama gušterače GLP-1 veže se za GLP-1R, posljedično aktivira cAMP, te uslijed nekoliko daljnjih reakcija dolazi do lučenja inzulina (92). GLP-1 u jetri, skeletnom mišiću i masnim stanicama povećava uporabu glukoze potičući sintezu glikogena i lipida, neovisno o inzulinu (93). Zovu ga još inzulinotropnim i glukagonostatskim hormonom zbog svojih učinaka, ali važno je naglasiti da su oba učinka ovisna o glukozi. Aktivni GLP-1 (7-36) amid (aGLP-1) kada se izluči u krv ima kratko poluvrijeme života (1-2 minute) zbog brze N-terminalne razgradnje pomoću enzima dipeptidilpeptidaze-IV (DPP-IV, od eng. *dipeptidyl peptidase-IV* ili CD26), glomerulske filtracije i bubrežnog tubulskog katabolizma u inaktivni metabolit GLP-1 (9-36) amid (iGLP-1) (94-96). Većinu bioloških učinaka u ljudi posjeduje aGLP-1 (83), no malo GLP-1 (oko 10-15%) stigne u sustavni krvotok u aktivnom obliku (97), te su nerijetko njegove koncentracije u krvi nemjerljive i ne moraju značajno narasti nakon obroka. Plazmatske koncentracije ukupnog GLP-1 (7-36&9-36) (uGLP-1) obuhvaćaju koncentraciju aktivnog hormona (7-36) te inaktivnog primarnog metabolita (9-36). Smatra se da je koncentracija uGLP-1 bolji pokazatelj cjelokupne sekrecije GLP-1, te se uz mjerenje koncentracije aGLP-1 predlaže mjeriti i koncentraciju uGLP-1 (98, 99). U fiziološkim uvjetima koncentracija GLP-1 u krvi je niska natašte, otpusti se u

krvotok 5-15 minuta nakon unosa hrane. Ima bifazični obrazac lučenja, početni brzi skok GLP-1 je oko 15-30 minuta iza jela, a zatim kasniji manji skok GLP-1 je oko 90-120 minuta iza jela (100). Hrana prvo posredno, preko proksimalno-distalne živčano-crijevne petlje, potiče lučenje GLP-1 (autonomni živčani sustav), a potom izravno, putem L- stanica crijeva. Koncentracija GLP-1 se vraća na bazalne vrijednosti nakon 2-3 sata (101). Raspon koncentracije uGLP-1 u zdravih osoba iznosi oko 8-50 pmol/l (vrijednosti natašte i postprandijalno) (102). Opisano je da je u osoba s kroničnom bubrežnom bolesti (KBB) koncentracija GLP-1 povišena (103), jer se izlučuje bubrezima.



Slika 1. Metabolički učinci peptida 1 sličnog glukagonu (GLP-1). Peroralnim unosom hrane dolazi do lučenja GLP-1 iz crijeva u krv gdje se unutar 1-2 minute pomoću enzima dipeptidil peptidaze-IV (DPP-IV) većina aktivnog GLP-1 (7-36) (aGLP-1) razgradi u inaktivni metabolit GLP-1 (9-36). Biološke učinke u tijelu ostvaruje većinom aGLP-1. U gušterači potiče lučenje i sintezu inzulina ovisno o glukozu, smanjuje lučenje glukagona ovisno o glukozu, u životinjskim modelima potiče rast i masu  $\beta$ -stanice gušterače te smanjuje apoptozu. U jetri smanjuje proizvodnju glukoze, dok u jetri, mišićima i masnim stanicama povećava uporabu glukoze povećavajući sintezu glikogena i lipida. Smanjuje pražnjenje želuca, lučenje kiseline, pokretljivost crijeva i apsorpciju lipida. Putem hipotalamusa smanjuje tek te dovodi do gubitka tjelesne mase, a postoje naznake neuroprotektivnog, kardioprotektivnog, retinoprotektivnog i renoprotektivnog djelovanja.

### 1.2.2. GLP-1 u šećernoj bolesti tipa 2

U osoba sa ŠBT2 inkretinski učinak je smanjen (104-107), te primjena GLP-1 i njegovih analoga značajno poboljšava regulaciju glikemije, lipidemiju, smanjuje TM i IR, te postoje naznake mogućeg kardioprotektivnog, renoprotektivnog, retinoprotektivnog i neuroprotektivnog djelovanja (90, 108-114). Postoje i naznake da bi terapija GLP-1 analozima mogla usporiti stvaranje naprednih završnih proizvoda glikacije (AGE, od eng. *advanced glycation end-products*) koji doprinose razvoju mikrovaskularnih komplikacija, a luče se tijekom kronične hiperglikemije (115). Međutim, ograničen je učinak endogenog GLP-1 zbog brze razgradnje pomoću DPP-IV. Zbog navedenih pozitivnih učinaka GLP-1 posljednjih su godina odobrene nove terapijske mogućnosti u liječenju osoba sa ŠBT2: GLP-1 analozi ili inkretinski analozi (IA) te inhibitori enzima DPP-IV (116).

Donedavno se mislilo da je smanjeno postprandijalno lučenje GLP-1 temeljni mehanizam kojim se objašnjava smanjeni inkretinski učinak u osoba sa ŠBT2 (89). Posljednjih godina mnogo je istraživanja posvećeno tome je li zapravo lučenje GLP-1 nakon obroka smanjeno u osoba sa ŠBT2 u odnosu na zdrave (105, 117). Nedavno objavljena meta analiza kliničkih istraživanja i sustavni pregled Calanna i sur. (22 studije, 275 osoba sa ŠBT2 i 279 zdravih kontrolnih ispitanika) o lučenju GLP-1 u osoba sa ŠBT2 je pokazala da osobe sa ŠBT2 nemaju smanjeno lučenje uGLP-1 nakon OGTT ili obroka, ali da je regulacija glikemije mjerena pomoću HbA1c negativno povezana s postprandijalnom plazmatskom koncentracijom uGLP-1 (118). Ostalo je nejasno je li smanjeno postprandijalno lučenje GLP-1 koje je opisano u nekim drugim istraživanjima posljedica sekundarnih metaboličkih obilježja ispitivane skupine ili je samo slučajnost. Većina je do sada citiranih radova o lučenju GLP-1 u osoba sa ŠBT2 opisivala smanjeno lučenje GLP-1 (119, 120), ali su u istraživanje bile uključene osobe starije dobi, s duljim trajanjem ŠBT2 te lošijom regulacijom glikemije. Također je u pojedinim izvješćima do sada opisivana negativna korelacija između indeksa tjelesne mase (ITM) i postprandijalne koncentracije GLP-1 (119, 121). Calann i sur. su u ovom sustavnom pregledu opisali da ITM nije čimbenik koji utječe na postprandijalno lučenje GLP-1. Pokazali su da se profil

lučenja GLP-1 mijenja tijekom napredovanja ŠBT2, kao što je opisano u životinjskim i *in vitro* modelima (118, 122). U ranom stupnju ŠBT2 opisano je čak jače postprandijalno lučenje GLP-1, što se pokušava objasniti IR i hiperinzulinemijom u početku ŠBT2 te kompenzacijskim pojačanim lučenjem GLP-1 iz L- stanica crijeva, a zatim poslije, s trajanjem ŠBT2, i lošijom regulacijom glikemije dolazi do iscrpljenja L- stanica crijeva. Zaključno, do sada se mislilo da je „smanjeno postprandijalno lučenje GLP-1“ temeljni mehanizam kojim se objašnjava smanjeni inkretinski učinak u osoba sa ŠBT2, međutim, najnovija istraživanja pretpostavljaju da je „smanjeni učinak GLP-1“ temeljni mehanizam koji dovodi do smanjenog inkretinskog učinka u osoba sa ŠBT2 te da hiperglikemija smanjuje izražaj GLP-1 receptora na  $\beta$ -stanici gušterače, dovodeći do „GLP-1 rezistencije“ (123). Sukladno tomu su neke studije opisale smanjeni inkretinski učinak unatoč normalnoj koncentraciji GLP-1 u osoba sa ŠBT2 (124-128).

### **1.2.3. Inzulinska rezistencija i GLP-1**

Posljednjih godina istražuje se primjena GLP-1 analoga u osoba s IR te MS, no malo se zna o endogenim plazmatskim koncentracijama GLP-1 u osoba s IR i MS. Pretpostavlja se da u osoba s IR masne stanice, koje su otporne na inzulin, otpuštaju slobodne masne kiseline (SMK) koje potiču lučenje GLP-1, a koji zatim potiče sintezu masti iz triglicerida. Infuzija GLP-1 analoga sprječava postprandijalni porast koncentracije triglicerida i SMK u zdravih ljudi (129).

Već je navedeno da primjena GLP-1 analoga poboljšava IR, te da postoje naznake mogućeg kardio/vazoprotektivnog djelovanja (modulacija srčane frekvencije, krvnog tlaka, žilnog tonusa, kontraktilnosti miokarda) neovisno o učinku na metabolizam glukoze (110, 130-133). U Japanskoj studiji 2010. godine, koja je uključila 97 ispitanika, opisana je povišena koncentracija GLP-1 u osoba s MS koji imaju povišen srčanožilni rizik, neovisno o prisustvu ŠB (134). Također su Japanci opisali da se povišenjem broja sastavnica koje ulaze u kriterij za definiciju MS proporcionalno povišuje koncentracija GLP-1 te da GLP-1 pozitivno korelira s C-reaktivnim proteinom (CRP) i trigliceridima, a negativno s HDL kolesterolom. Oni objašnjavaju povišenu koncentraciju GLP-1

povećanim kalorijskim unosom hrane u osoba s MS (135). Pretpostavljaju da bi visoke koncentracije GLP-1 u osoba s MS mogle biti predskazatelj ateroskleroze te da povišene koncentracije GLP-1 u osoba s MS nagoviještaju prisustvo „GLP-1 rezistencije“. Nedavno je Piotrowski u više od 300 osoba koje su išle na invazivnu kardiološku obradu opisao pozitivnu povezanost između endogene koncentracije GLP-1 s koronarnom aterosklerozom (136), što je bilo iznenađujuće, uzevši u obzir da je primjena GLP-1 analoga u eksperimentalnim modelima i kliničkim istraživanjima imala zaštitni učinak na srce. Oni su potvrdili pozitivnu povezanost između GLP-1 s trigliceridima, objašnjavajući to kontraregulacijskim mehanizmom, da bi se povećalo lučenje inzulina u stanjima s IR, a na taj način objašnjavaju i povišenu koncentraciju GLP-1 u osoba s koronarnom aterosklerozom (kontraregulacijski mehanizam da se zaustavi progresija bolesti).

#### **1.2.4. GLP-1 u šećernoj bolesti tipa 1**

Uloga GLP-1 u metabolizmu glukoze i lipida u ŠBT1 novo je područje znanstvenog zanimanja, a rezultati postojećih istraživanja nisu jednoznačni. U dosadašnjim istraživanjima su opisane niže, ali i jednake bazalne vrijednosti GLP-1 u odnosu na nedijabetičku populaciju (137, 138). Opisan je oslabljeni postprandijalni porast GLP-1 u osoba sa ŠBT1 (139) objašnjen smanjenjem osjetljivošću L-stanica uslijed IR, manjka inzulina i kronične hiperglikemije (137). S druge strane, neka istraživanja navode jednaku postprandijalnu koncentraciju GLP-1 u zdravih ispitanika te u onih koji imaju ŠBT1 (138, 140). U jednoj je pak pedijatrijskoj studiji, smanjenje  $\beta$ -stanične funkcije tijekom prve godine ŠBT1 bilo povezano s povišenjem koncentracije GLP-1 (141). U istraživanju Kaasove i sur., u novodijagnosticirane djece i adolescenata sa ŠBT1, opisana je niža koncentracija GLP-1 u osoba s djelomičnom remisijom bolesti u odnosu na osobe bez remisije (142). Istraživanje Greenbaumove je pokazalo da nema razlike u bazalnim i postprandijalnim koncentracijama GLP-1 između osoba sa ŠBT1 i zdravih kontrolnih ispitanika, ali je našao značajnu razliku u inkretinskom učinku- osobe sa ŠBT1 su imale značajno smanjeni inkretinski učinak, ali ne odsutan kao što je opisan u ŠBT2 (143), odnosno imale su smanjenu

postprandijalnu koncentraciju inzulina u usporedbi sa zdravim kontrolnim ispitanicima. Smanjeni inkretinski učinak unatoč jednakim koncentracijama GLP-1 objašnjava oštećenjem  $\beta$ -stanica, selektivnim poremećajem u odgovoru GLP-1 ili u poremećaju živčanih signala koji se aktiviraju unosom glukoze, te smatra da je smanjeni inkretinski učinak u tih osoba odgovoran za postprandijalnu hiperglikemiju (144). Istraživanje pak Kielgasta opisuje podjednak inkretinski učinak u osoba sa ŠBT1 bez ostatne  $\beta$ -stanične funkcije, u osoba sa ŠBT1 s ostatnom  $\beta$ -staničnom funkcijom te u zdravih kontrolnih ispitanika. Opisuje podjednake bazalne koncentracije GLP-1 (15-20 pmol/l) u svih navedenih ispitanika (145). Navedene različite, odnosno oprečne koncentracije GLP-1 u osoba sa ŠBT1 za sada se objašnjavaju različitim mjernim postupcima, različitim obilježjima ispitanika te različitoj inzulinskoj terapiji (105).

U osoba sa ŠBT1, koji nemaju ostatnu aktivnost  $\beta$ -stanica, infuzija GLP-1 smanjuje koncentraciju glukoze u krvi smanjujući lučenje glukagona neovisno o endogenom inzulinu (145-147), ali samo u prisutnosti hiperglikemije, što je važno, jer ne povećava rizik od hipoglikemija. Još uvijek nije razjašnjeno kojim točno mehanizmom GLP-1 djeluje na glukagon, opisuje se parakrini učinak preko somatostatina i inzulina (92, 148, 149) te izravan učinak koji je upitan, jer nije sigurno postoje li GLP-1R na  $\alpha$ -stanicama gušterače (150-154). Neki radovi opisuju obrnuti, poticajni učinak GLP-1 na glukagon, što objašnjavaju izravnom stimulacijom glukagona u C-peptid negativnih bolesnika ili nedostatnom inhibicijom lučenja glukagona zbog ukupno niske koncentracije GLP-1, a opisuje se i postojanje mogućeg autoimunog procesa na  $\alpha$ -stanicama gušterače (137, 141, 144).

Opisana je negativna povratna sprega između inzulina i GLP-1 u osoba sa ŠBT1, navodno inzulin inhibira lučenje GLP-1 (155-157). Zanimljiva je pretpostavka nekih istraživanja da egzogeni inzulin ima antagonistički učinak na GLP-1 pojačavajući aktivnost DPP-IV enzima (138, 139). Istraživanja opisuju razlike u postprandijalnom odgovoru GLP-1 u osoba sa ŠBT1 koji su primili terapiju inzulinom, i to opisuju razlike s obzirom na vrstu inzulina (bazalni ili bolus inzulin) (139, 157). Do sada nije mjerena aktivnost DPP-IV enzima u

serumu natašte i postprandijalno te uspoređivana s natašte i postprandijalnim vrijednostima GLP-1 i vrstom inzulina, jer serumski aktivnost DPP-IV odražava samo 5% ukupne aktivnosti DPP-IV (158). Shigeto je opisao da fiziološki niska koncentracija GLP-1 potiče inzulinsku sekreciju *in vitro* neovisno o mehanizmu pomoću cAMP (159). Navodno kalorijska vrijednost obroka i postotak masti u hrani utječu na postprandijalni odgovor GLP-1 više od samog inzulina (138, 160).

Nekoliko kratkotrajnih i malih studija je pokazalo do sada obećavajući terapijski učinak GLP-1 analoga u osoba sa ŠBT1 (147, 161-164) dok s druge strane postoje istraživanja u kojima se nije pokazao superioran terapijski učinak DPP-IV inhibitora (sitagliptina) u regulaciji glikemije, unatoč postprandijalnom porastu koncentracije GLP-1 u osoba sa ŠBT1 (165). Rezultati na životinjskim modelima upućuju da primjena GLP-1, odnosno njegovog analoga, u ŠBT1 smanjuje albuminuriju neovisno o učinku na glikemiju (166-170). Mehanizam povezanosti moguć je smanjenjem IR, budući da GLP-1 potiče lučenje adiponektina preko protein kinaze A, te tako poboljšava IR (171). Opisan je i učinak GLP-1 na smanjenje progresije dijabetičke neuropatije u miševa sa ŠBT1 (140, 172). Eksperimentalna istraživanja opisuju moguć pozitivan učinak GLP-1 u sprječavanju dijabetičke retinopatije (173, 174), na poboljšanje glukoregulacije te smanjenje potrebe za inzulinom (175). Zaštitnim učinkom GLP-1 na hiper- i hipoglikemiju smanjuje se indukcija endotelne disfunkcije, oksidativnog stresa i sustavne upale (176). U bolesnika sa ŠBT1 glavni cilj liječenja je prevencija nastanka mikrovaskularnih komplikacija koje dovode do završnog stupnja KBB i sljepoće. Možda bismo terapijom IA u ŠBT1, uz inzulinsku terapiju, mogli pridonijeti smanjenju IR, a na taj način spriječiti nastanak mikrovaskularnih komplikacija.

### 1.3. Čimbenik rasta fibroblasta

Obitelj čimbenika rasta fibroblasta (FGF, od eng. *fibroblast growth factor*) sastoji se od 22 člana (bjelančevina) koji imaju ključnu ulogu u razvoju, diferencijaciji i metabolizmu sisavaca (177). Obitelj FGF se dijeli u 3 podobitelji: unutarstanična, hormonska i parakrina obitelj. Hormonska obitelj FGF nadzire

različite metaboličke procese: FGF-19 (metabolizam glukoze, lipida i žučnih kiselina), FGF-21 (metabolizam glukoze i lipida) i FGF-23 (metabolizam fosfora i vitamina D) (178-180). Ostvaruju svoje učinke aktivacijom staničnih tirozinkinaznih receptora za FGF (FGFR). Za razliku od ostalih FGF, nedostaje im klasično heparinsko-vezno mjesto, pa se nalaze u cirkulaciji u slobodnom obliku kao pravi hormoni te u ovisnosti o kočimbeniku Klothu ostvaruju učinke na ciljnim organima (181). Klotho ( $\alpha$ ) i  $\beta$ Klotho određuju tkivnu selektivnost ova 3 čimbenika. FGF-19 i FGF-21 ovisni su o  $\beta$ Klothu, imaju slične metaboličke učinke, ali zbog mogućeg mitogenog učinka FGF-19 (182), osvrnut ću se ovdje na FGF-21.

### 1.3.1. Fiziologija FGF-21

FGF-21 je cirkulirajući hormon (adipokin) od 181 aminokiseline izvedene od zrele bjelančevine sastavljene od 209 aminokiselina kodiranog *FGF21* genom koji je lociran na 19. kromosomu (183). Ljudski FGF-21 je vrlo sličan mišjem FGF-21 (imaju oko 75% identičnosti u redoslijedu aminokiselina), no neki se učinci FGF-21 razlikuju između životinjskih modela i ljudi. Kharitonov je prvi otkrio da FGF-21 potiče unos glukoze u mišjim adipocitima i primarnim kulturama ljudskih adipocita (184), a tek poslije se spoznalo da ima brojne značajne učinke *in vivo*. Do sada je istraživana njegova koncentracija u zdravih kontrolnih ispitanika, trudnica, osoba sa ŠBT2, IR, MS, pretilih osoba, osoba s nealkoholnom masnom bolesti jetre, te pokoje istraživanje postoji o koncentraciji FGF-21 u osoba sa ŠBT1. Za sada nisu jasni svi fiziološki učinci FGF-21 u ljudi (Slika 2.). Značajan je u kontroli homeostaze energije, zovu ga biljekom metaboličke bolesti te se smatra da ima zaštitnu metaboličku ulogu.

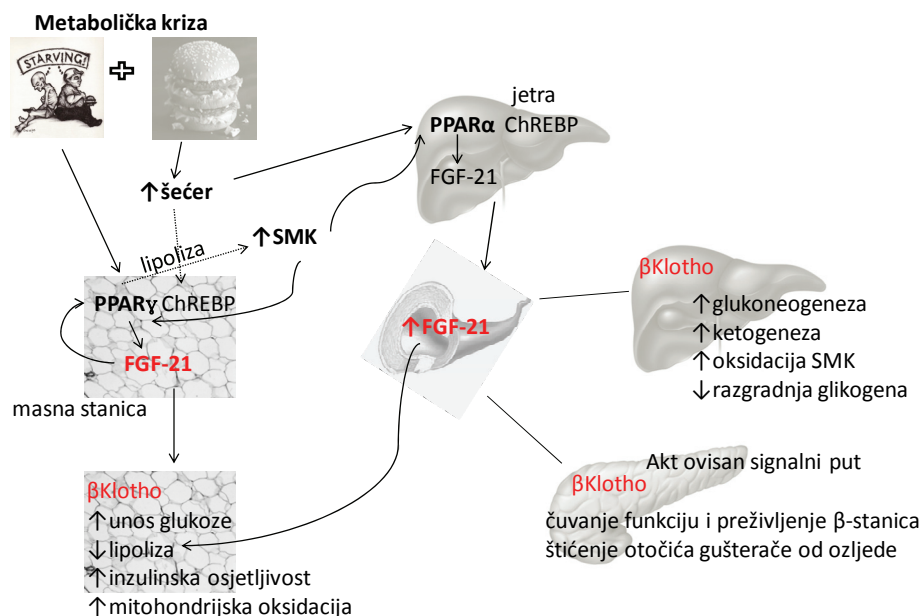
Proizvodi se najviše u jetri i masnom tkivu, zatim gušterači, skeletnom mišiću i timusu, a tkivno-specifično djelovanje je uvjetovano ograničenim izražajem  $\beta$ Klotho, pretežito u metabolički aktivnim organima (gušterača, jetra i masne stanice) (185-187). Ne zna se doprinos pojedinog tkiva plazmi (188), a opisuje se i moguće postojanje puta neovisnoga o  $\beta$ Klothu (189). Opisan je paradoksnu izražaj *FGF-21* gena u jetri- neovisno je reguliran i gladovanjem i hranom- naglašavajući da je FGF-21 povišen u metaboličkim krizama (gladovanje i



prekomjerno hranjenje) (190). U tim stanjima je povišena koncentracija SMK koja potiče lučenje FGF-21 tako što se SMK i glukoza vežu i aktiviraju čimbenike koji pojačavaju izražaj FGF-21.

U jetri u stanju gladovanja SMK potiču aktivator- $\alpha$  peroksisomnog rastućeg receptora (PPAR $\alpha$ , od eng. *peroxisome proliferator-activated receptor alpha*) koji potiče lučenje FGF-21 te dolazi do pojačane glukoneogeneze, ketogeneze te oksidacije SMK (pojačana proizvodnja i iskorištavanje energije). U jetri u stanju prekomjernog hranjenja povišena koncentracija glukoze potiče aktivaciju vežuće bjelančevine koja odgovara na ugljikohidrate (ChREBP, od eng. *carbohydrate response element binding protein*) te dolazi do pojačane sinteze triglicerida (190). Čini se da je djelovanje FGF-21 drukčije tijekom gladovanja u odnosu na prekomjerno hranjenje.

U masnim stanicama tijekom hranjenja dolazi do aktivacije PPAR $\gamma$  koji potiče proizvodnju FGF-21 da preko prijenosnika glukoze 1 (GLUT1, prema eng. *glucose transporter 1*) poveća unos glukoze neovisno o inzulinu te poveća daljnju aktivaciju PPAR $\gamma$  (191-193). FGF-21 aktivacijom adenozin monofosfat protein kinaze i sirtuina 1 povećava mitohondrijsku oksidativnu funkciju u masnim stanicama (194). U gušterači, preko Akt-ovisnog signalnog puta, FGF-21 čuva funkciju i preživljenje  $\beta$ -stanica (195) te štiti otočiće gušterače od ozljeda (196, 197). Nakon što se proizvede iz masnog tkiva ne luči se u cirkulaciju, već djeluje autokrino, pojačavajući učinak PPAR $\gamma$  receptora (198). Međutim, nakon što se proizvede iz jetre luči se u cirkulaciju i posjeduje svoje endokrine učinke na metaboličkim aktivnim organima. Poluživot FGF-21 je 1-2 sata, a izlučuje se iz organizma bubrezima. Neki učinci FGF-21 su slični glukagonu, ali ne povećava glikogenolizu (199). Referentni raspon u zdravih ljudi je različit, od 20-5300 pg/ml (200-202). U nekim istraživanjima nije bilo razlike u FGF-21 s obzirom na spol (203), u jednom je istraživanju opisana niža koncentracija FGF-21 u žena (204), dok u novijem istraživanju opisuju višu koncentraciju FGF-21 u djevojčica (205). Navodno se luči u cirkulaciju pulsatilnim načinom (202, 206), a postoje naznake i cirkadijanog ritma lučenja tijekom gladovanja, koje je uvjetovano koncentracijom SMK (207).



Slika 2. Metabolički učinci čimbenika rasta fibroblasta-21 (FGF-21). Gladovanje ili prekomjerno hranjenje su poticaj za lučenje FGF-21 koji svoju aktivnost izražava na metabolički aktivnim organima koji posjeduju kočimbenik  $\beta$ Klotho. Gladovanje dovodi do lipolize u masnim stanicama te do izlaska SMK u cirkulaciju do jetre, gdje SMK potiču izražaj aktivatora- $\alpha$  peroksisomnog rastućeg receptora (PPAR $\alpha$ ) koji pojačava izražaj i lučenje FGF-21 da poveća proizvodnju i iskorištavanje energije. U jetri FGF-21 potiče glukoneogenezu, ketogenezu te oksidaciju masnih kiselina, a u masnim stanicama koči lipolizu. Također smanjuje lučenje glukagona i na taj način poboljšava inzulinsku osjetljivost. U gušterači djeluje putem Akt-ovisnog signalnog puta te čuva funkciju i preživljenje  $\beta$ -stanica gušterače. Autokrino djelovanje FGF-21 u masnim stanicama je potaknuto hranjenjem preko PPAR $\gamma$  receptora koji pojačavaju izražaj FGF-21. Putem receptora prijenosnika glukoze 1 (GLUT1) povećava unos glukoze, a preko adenozin monofosfat protein kinaze FGF-21 povećava mitohondrijsku oksidaciju u masnim stanicama.

### 1.3.2. Inzulinska rezistencija i FGF-21

Iako se prvotno mislilo da FGF-21 potiče lipolizu u masnim stanicama (193), nekoliko drugih novijih istraživanja je opisalo da FGF-21 smanjuje lipolizu u masnim stanicama (192). Smanjenjem lipolize te smanjenim lučenjem glukagona poboljšava IO u ljudi (208). Paradoksalno povišene koncentracije FGF-21 opisuju se u različitim stanjima s povišenom IR (ŠBT2, nealkoholni steatohepatitis, pretilost, gestacijska ŠB, sindrom policističnih jajnika, Cushingov sindrom te završni stupanj KBB) (186, 201, 209-212). Pretpostavlja se da postoji kompenzacijsko povišenje FGF-21 u stanjima s IR da nadvlada postojeću IR (mehanizam protiv glukotoksičnosti i lipotoksičnosti) (213, 214), a moguće je i da postoji „rezistencija na FGF-21“ u stanjima povezanim s IR (215, 216). U pretilosti je opisana „rezistencija na FGF-21“ zbog smanjene osjetljivosti

FGFR (216). U nekim istraživanjima je opisano da FGF-21 neovisno pozitivno korelira s IR, dislipidemijom i MS (209, 217). Smatra se da bi FGF-21 mogao mijenjati unos lipoproteina te da bi se na taj način mogla objasniti povezanost FGF-21 s aterosklerozom (218). Davanje fibrata (PPAR $\alpha$  agonista) potiče jetreni izražaj FGF-21 (202). Opisano je da FGF-21 negativno korelira s IO u mišićnim stanicama te izravno s jetrenim indeksom IR u osoba sa ŠBT2 (210). Međutim, postoje istraživanja u osoba bez ŠB, u kojima nije nađena povezanost FGF-21 s mjerama pretilosti, IO i masnim kiselinama (202, 204). U jednom je pak istraživanju opisana pozitivna povezanost FGF-21 s HDL kolesterolom (201). U novijem istraživanju u djece je opisana negativna povezanost FGF-21 s aktivnošću  $\beta$ Klotho te težinom nealkoholne jetrene bolesti, što objašnjavaju smanjenim prijemom *FGF-21* gena uslijed oksidativnog stresa i povišene koncentracije čimbenika tumorske nekroze  $\alpha$  (219-221). FGF-21 pozitivno korelira s upalnim biljezima. Povišene koncentracije FGF-21 povezane su sa pretilošću u djece i u odraslih (213, 217, 222). Postoji pozitivna korelacija između FGF-21 s ITM i leptinom, a negativna s adiponektinom (223, 224). Također je opisano da mršavljenjem dolazi do pada koncentracije FGF-21, iako su opisane studije u kojima ne dolazi do pada koncentracije FGF-21 tijekom mršavljenja (186, 225, 226). Kontraverzni rezultati postoje u osoba s anoreksijom. U osoba sa SŽB uočene su povišene koncentracije FGF-21, što objašnjavaju kompenzacijskim povišenjem FGF-21 ili „rezistencijom na FGF-21“ (227). U jednom novijem istraživanju je opisan porast koncentracije FGF-21 s porastom broja sastavnica MS te je opisano da je FGF-21 neovisni rizični čimbenik SŽB (203). Uočen je izražaj FGF-21 mRNA (eng. *messenger* RNA) u srčanim endotelnim stanicama, te se pretpostavlja da bi FGF-21 mogao sprječavati apoptozu (228). Terapija rekombinantnim FGF-21 u životinjskim modelima korigira metaboličke parametre: smanjuje glikemiju, lipidemiju (smanjuje LDL, trigliceride i ukupni kolesterol, a povećava HDL kolesterol), povećava IO te dovodi do gubitka na TM (229, 230).

### **1.3.3. FGF-21 u šećernoj bolesti tipa 2**

Opisano je da je povišena koncentracija FGF-21 neovisan predskazatelj ŠBT2 (209, 217), te da je koncentracija FGF-21 neovisna o duljini trajanja ŠBT2 (231). Dodatak PPAR $\gamma$  agonista (rosiglitazona/pioglitazona), eksenatida ili inzulina na postojeću terapiju metforminom ili samo inzulinska terapija u bolesnika sa ŠBT2 značajno smanjuje koncentraciju FGF-21, nagovješćujući da koncentracija FGF-21 pada kako se poboljšava IO (232-234). Do sada je nekoliko izvješća opisalo povezanost povišenih koncentracija FGF-21 s kroničnim komplikacijama u ŠBT2 (201). Serumska koncentracija FGF-21 neovisno pozitivno korelira s albuminurijom u ŠBT2, upućujući na to da bi FGF-21 mogao biti povezan s nastankom dijabetičke nefropatije. Koncentracije FGF-21 su značajno više u bolesnika sa ŠBT2 koji imaju aterosklerotske promjene na karotidnim arterijama (211). Opisano je da povećana koncentracija FGF-21 u osoba sa ŠBT2 ima pozitivnu prediktivnu vrijednost za srčanožilne događaje (235). U drugom istraživanju u bolesnika sa ŠBT2 nije bilo povezanosti FGF-21 s mikrovaskularnim i makrovaskularnim komplikacijama (236). Opisana je i povišena koncentracija FGF-21 u osoba sa preeklampsijom (237). Na temelju svih anitiperiglikemijskih i antihiperlipemičnih učinaka kojima FGF-21 potiče IO smatra se da bi mogao imati terapijsko mjesto u liječenju stanja s povišenom IR, posebno ŠBT2. U eksperimentalnim istraživanjima primjena GLP-1 agonista (liraglutida) povećava aktivnost FGF-21 te poboljšava IO (238). Možda bismo povećanjem aktivnosti FGF-21 mogli liječiti IR, odnosno ŠBT2. Zbog navedenih pozitivnih učinaka GLP-1 i FGF-21 (nekih zajedničkih kao na IR) danas se već izrađuju farmakološki patentni spojevi GLP-1 i FGF-21 u svrhu liječenja pretilosti u osoba sa ŠBT2 (239).

### **1.3.4. FGF-21 u šećernoj bolesti tipa 1**

U osoba sa ŠBT1 značaj FGF-21 do sada nije sustavno istraživao. U istraživanju u kojemu je mjerena koncentracija FGF-21 u osoba sa ŠBT1, zatim u osoba s latentnim autoimunim dijabetesom u odraslih, u osoba sa ŠBT2 te u zdravih kontrolnih ispitanika, opisana je smanjena koncentracija FGF-21 u osoba sa ŠBT1 u usporedbi na kontrolnu zdravu skupinu te u usporedbi na

latentni autoimuni dijabetes u odraslih i ŠBT2. Nakon prilagodbe prema ITM i dalje je bila značajno niža koncentracija FGF-21 u osoba sa ŠBT1 u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu. Opisana je također negativna povezanost između koncentracije FGF-21 s protutijelima na otočice gušterače te pozitivna povezanost između koncentracije FGF-21 s C-peptidom natašte (240). Ne zna se mehanizam djelovanja, ali moguće da su uništenje  $\beta$ -stanica gušterače i posljedično smanjena proizvodnja FGF-21 iz gušterače uzrok nižim koncentracijama FGF-21 u osoba sa ŠBT1. Međutim, ne zna se još koliki je doprinos gušterače plazmatskim koncentracijama FGF-21.

Zanimljiv je utjecaj inzulina na koncentraciju FGF-21 o čemu postoje kontradiktorna izvješća. Neka istraživanja opisuju da umjetno izazvana hiperinzulinemija u zdravih ljudi dovodi do porasta koncentracije FGF-21 (241), dok drugi opisuju povišenje koncentracije FGF-21 kod osoba sa ŠBT1 bez terapije inzulinom što se objašnjava povišenom koncentracijom SMK u slučajevima potpunog manjka inzulina (241, 242). Postavlja se pitanje suprimira li inzulin u mršavih ljudi lučenje FGF-21 te postoji li razlika između djelovanja endogenog i egzogenog inzulina na koncentraciju FGF-21. Opisana je pozitivna korelacija između suprafizioloških koncentracija SMK s koncentracijom FGF-21 (241). Odgovor FGF-21 na inzulin ovisi o nekoliko čimbenika: debljina, koncentracija SMK, koncentracija inzulina i IR (188). U istraživanju Hojmana i sur. uočeno je da inzulin potiče FGF-21 izražaj u mišićnim stanicama i plazmi, no nije uočena povezanost između mišićne koncentracije FGF-21 i plazmatske koncentracije FGF-21 (187).

Najnovije istraživanje je opisalo da primjena glukagona u zdravih i osoba sa ŠBT1 povišuje koncentraciju FGF-21 (243). Koncentracija FGF-21 je povišena u bolesnika s KBB te se proporcionalno povećava s pogoršanjem bubrežne funkcije (244-247). U osoba sa ŠBT1 bubrežna funkcija je neovisni prediktivni čimbenik srčanožilnog mortaliteta (248). Do sada nije istraživana povezanost koncentracije FGF-21 s glikemijom, lipidemijom te mikrovaskularnim komplikacijama u osoba sa ŠBT1.

## 2. HIPOTEZA

Viša koncentracija peptida 1 sličnog glukagonu (uGLP-1 i aGLP-1) i niža koncentracija čimbenika rasta fibroblasta-21 (FGF-21) u plazmi povezana je s boljom regulacijom glikemije, boljim lipidnim profilom i manjom prevalencijom mikrovaskularnih komplikacija u osoba sa šećernom bolesti tipa 1.

### Obrazloženje hipoteze

Do sada objavljena istraživanja pokazuju kontradiktorne rezultate vezano uz koncentraciju GLP-1 u osoba sa ŠBT1. U osoba sa ŠBT2 viša koncentracija GLP-1 je povezana s boljom regulacijom glikemije, boljim lipidnim profilom i manjom prevalencijom mikrovaskularnih komplikacija. Pretpostaviti je da i u osoba sa ŠBT1 postoji takva povezanost. Dosadašnja istraživanja u zdravih ljudi te u osoba sa ŠBT2 pokazala su da je koncentracija FGF-21 povišena u stanjima s povišenom IR, iako postoje kontraverzni rezultati. Smatra se da je to kompenzacijsko povišenje prisutno da nadvlada postojeću IR. Koncentracija FGF-21 u osoba sa ŠBT1 je do sada malo istraživana, te nije ispitivana povezanost FGF-21 s glikemijom, lipidemijom i mikrovaskularnim komplikacijama osoba sa ŠBT1. Moguće je da je niža koncentracija FGF-21 povezana s boljom regulacijom glikemije, boljim lipidnim profilom i manjom prevalencijom mikrovaskularnih komplikacija u osoba sa ŠBT1.

### 3. CILJEVI

Osnovni cilj istraživanja je analizirati koncentracije GLP-1 (uGLP-1 i aGLP-1) i FGF-21 u plazmi te ispitati povezanost koncentracija uGLP-1, aGLP-1 i FGF-21 u plazmi s regulacijom glikemije, lipidemijom i mikrovaskularnim komplikacijama u osoba sa ŠBT1.

Ostali ciljevi uključuju:

- ispitati međusobni odnos koncentracija uGLP-1, aGLP-1 i FGF-21 u plazmi u osoba sa ŠBT1.
- ispitati povezanost koncentracija uGLP-1, aGLP-1 i FGF-21 u plazmi s IR (MS), koncentracijom glukagona u plazmi te ukupnom dnevnom dozom inzulina.
- usporediti plazmatske koncentracije uGLP-1, aGLP-1 i FGF-21 između osoba sa ŠBT1 i zdravih kontrolnih ispitanika.

## 4. MATERIJALI I METODE

Učinjeno istraživanje je dio znanstveno-istraživačkog projekta br. 045-1080230-0516 Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa, pod nazivom „Metabolički sindrom u šećernoj bolesti tipa 1“.

Prema vrsti dizajna studije ovo istraživanje je opservacijsko, presječno (eng. *cross-sectional study*). Istraživanje je bilo provedeno tijekom 2013. godine.

### 4.1. Ispitanici i kontrolna skupina

Istraživanje je provedeno u 30 ispitanika sa ŠBT1 te u 10 zdravih kontrolnih dobrovoljaca. Uzorak ispitanika sa ŠBT1 se oblikovao na način da je prvih 30 redovito hospitaliziranih bolesnika (od početka provedbe istraživanja) u Zavodu za endokrinologiju, diabetologiju i bolesti metabolizma Sveučilišne Klinike „Vuk Vrhovac“, koji zadovoljavaju uključne kriterije istraživanja uz potpisani informirani pristanak uključeno u istraživanje. Skupina zdravih kontrolnih dobrovoljaca je slučajno izabrana ukoliko su dobrovoljci imali osobine ispitanika, zadovoljavali uključne kriterije istraživanja uz potpisani informirani pristanak. ŠBT1 dijagnosticirana je na temelju kriterija SZO (249): manje od 40 godina prilikom otkrivanja bolesti, epizoda dijabetičke ketoacidoze ili dokazane ketonurije u anamnezi, pozitivni autoimuni biljezi te nužnost inzulinske terapije unutar godine dana nakon otkrivanja bolesti. Uključujući kriteriji za ispitanike sa ŠBT1 bili su dob od 18 do 65 godina, najmanje trajanje ŠBT1 od jedne godine, bez anamneze SŽB, teške jetrene bolesti, bez KBB 3b stupnja i više- CKD EPI (od eng. *Chronic Kidney Disease Epidemiology*) >45 ml/min te bez adrenalne insuficijencije. Ispitanici sa ŠBT1 su liječeni intenziviranom inzulinskom terapijom dugodjelujućim (bazalnim) inzulinom u jednoj ili dvije dnevne doze uz ultrakratkodjelujući (bolus) inzulin u tri dnevne doze prije glavnih obroka.

Nakon pristanka obaviještenih ispitanika, izvađena je u istom danu krv natašte i postprandijalno te je tijekom hospitalizacije dva puta skupljen 24- satni urin. Istražili smo 3 vrste uzoraka u ispitanika sa ŠBT1 (uzorak plazme, seruma i urina):



- 1) Uzorci plazme- koristili smo preostale uzorke venske krvi prikupljene na EDTA, venepunkcijom, prilikom uzimanja uzoraka krvi za ranije predviđenu dijagnostičku obradu. Ove epruvete smo koristili za mjerenje koncentracije glukagona. U svakog smo analizirali uzorke plazme uzete natašte (0') te postprandijalno (30').
- 2) Isti uzorci plazme, ali u posebnim epruvetama- BD<sup>TM</sup> P700 koje sadrže antikoagulant K2 EDTA te aditiv- inhibitor DPP-IV, uzimali smo venepunkcijom. Ove epruvete smo koristili sukladno uputama proizvođača, za mjerenje koncentracije ukupnog i aktivnog GLP-1 budući da u sebi sadrže inhibitor enzima koji razgrađuje GLP-1. U svakog smo analizirali uzorke plazme uzete natašte (0') te postprandijalno (30').
- 3) Uzorci seruma- koristili smo preostale uzorke venske krvi prikupljene u epruvetu bez antikoagulanta, venepunkcijom, prilikom uzimanja uzoraka krvi za ranije predviđenu dijagnostičku obradu. Ove uzorke smo koristili za mjerenje koncentracije FGF-21. U svakog smo analizirali uzorke plazme uzete natašte (0') te postprandijalno (30').
- 4) Uzorci 24-satnog urina- koristili smo uzorke urina prikupljene u sklopu rutinske dijagnostičke kontrolne obrade. U svakog smo analizirali uzorke urina skupljene dva puta.

Uključeno je 10 ispitanika u zdravu kontrolnu skupinu (bez ŠBT1 ili ŠBT2, bez anamneze SŽB, teške jetrene, KBB teškog stupnja te bez adrenalne insuficijencije) koju smo odabrali među osobama koje po dobi ( $z=-0,907$ ,  $P=0,365$ ), spolu ( $\chi^2=0,533$ ,  $P=0,716$ ) i ITM ( $z=-0,395$ ,  $P=0,693$ ) najbliže odgovaraju ispitanicima sa ŠBT1. U ovih smo ispitanika analizirali uzorke plazme i seruma:

- 1) Uzorci plazme- koristili smo uzorke venske krvi prikupljene na EDTA, venepunkcijom. Ove epruvete smo koristili za mjerenje koncentracije glukagona. U svakog smo analizirali uzorke plazme uzete natašte (0') te postprandijalno (30').
- 2) Isti uzorci plazme, ali u posebnim epruvetama- BD<sup>TM</sup> P700 koje sadrže antikoagulant K2 EDTA te aditiv- inhibitor DPP-IV, uzimali smo

venepunkcijom. Ove epruvete smo koristili sukladno uputama proizvođača, za mjerenje koncentracija ukupnog i aktivnog GLP-1 budući da u sebi sadrže inhibitor enzima koji razgrađuje GLP-1. U svakog smo analizirali uzorke plazme uzete natašte (0') te postprandijalno (30').

- 3) Uzorci seruma - koristili smo uzorke venske krvi prikupljene u epruvetu bez antikoagulant, venepunkcijom. Ove uzorke smo koristili za mjerenje koncentracije FGF-21. U svakog smo analizirali uzorke plazme uzete natašte (0') te postprandijalno (30').

Svi uzorci krvi su primjereno i na jednak način pohranjeni od vremena uzorkovanja do analize (na  $-70^{\circ}\text{C}$ ).

#### **4.1.1. Veličina uzorka**

U istraživanje je bilo uključeno 40 ispitanika (30 ispitanika sa ŠBT1 i 10 zdravih kontrola), što je zadovoljavajuće prema G-power 3.1.3 metodi za računanje veličine uzorka.

t-test razlika između skupina- dovoljno 12 ispitanika (9 bolesnika+3 kontrole;  $\alpha=0,05$ ,  $1-\beta=0,88$ , srednja veličina učinka  $d=2,31$  i omjer kontrolne i ispitivane skupine 0,3;

“sample size table for correlation” potrebno je 30 ispitanika za statistički značajnu korelaciju koeficijenta 0,44.

#### **4.2. Postupci**

Kreatininemija, lipidogram, C-peptid, HbA1c, protutijela na otočiće gušterače u serumu i albuminurija u 24- satnom urinu mjereni su standardnim dijagnostičkim postupcima: kreatinin u serumu (spektrofotometrija, OLYMPUS AU400), lipidogram (spektrofotometrija, OLYMPUS AU400), C-peptid (kemiluminiscencija, ADVIA Centaur XP), HbA1c u punoj krvi (imunoturbidimetrija-TINIA, COBAS INTEGRA), GAD, IA-2 (ELISA; fotometar STATFAX 2100), ICA (indirektna imunofluorescencija na mikroskopu), albuminurija u 24- satnom urinu (imunoturbidimetrija).

#### **4.2.1. Mjerenje inzulinske rezistencije**

IR procijenila se pomoću vrijednosti eGDR. Izračunava se prema formuli  $24,31 - 12,2 \times OS / OB - 3,29 \times \text{krvni tlak} - 0,57 \times HbA1c$ . Vrijednost eGDR obrnuto korelira s IR (75).

#### **4.2.2. ELISA (od eng. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)**

Koncentracije uGLP-1, aGLP-1 i glukagona u plazmi te FGF-21 u serumu izmjerili smo pomoću komercijalno dostupnog pribora s kemikalijama sukladno uputama proizvođača (Human Total GLP-1 (7-36&9-36) ELISA Kit, ALPCO, US; Human Active GLP-1 (7-36) ELISA Kit, ALPCO, US; Human, Mouse, Rat Glucagon ELISA Kit, ALPCO, US; Human FGF-21 Immunoassay Kit, ALPCO, US).

##### **4.2.2.1. Ukupni i aktivni GLP-1**

###### **Kemikalije i uzorci:**

1. Streptavidinom omotane mikrotitarske pločice (96 jažica)
2. GLP-1 protutijelo za obilježavanje (AB)
3. GLP-1 protutijelo za hvatanje (2.AB)
4. Koncentrirana otopina za ispiranje
5. SUB- supstrat TMB (tetrametilbenzidin) - kromogen
6. STOP- otopina za zaustavljanje reakcije
7. STD- standard (GLP-1 standard)
8. CTRL- kontrolni uzorak (GLP-1 kontrole)
9. Pufer za razrjeđivanje protutijela za obilježavanje

**Instrument:** Spektrofotometrijski čitač mikrotitarskih pločica (STATFAX 2100)

###### **Postupak:**

Svi reagensi su otopljeni do sobne temperature. Koncentrirana otopina za ispiranje je razrijeđena u omjeru 1:29. Liofilizirani standardi su rekonstituirani (u svaku epruvetu se dodalo 1 ml destilirane vode, 10 minuta ostavilo u mirovanju,

a zatim se nježno izmiješalo u miješalici). GLP-1 (7-36)&(9-36) mješavina protutijela se pripremila na idući način (u čistoj staklenoj epruveti): pomiješalo se GLP-1 protutijelo za obilježavanje i GLP-1 protutijelo za hvatanje u 1:21 razrjeđenju GLP-1 protutijela za hvatanje. Napravilo se 1:21 razrjeđenje biotiliniranog protutijela za hvatanje s puferom za razrjeđivanje protutijela za obilježavanje (za svaki red od 8 jažica se pomiješalo 1 mL pufera za razrjeđivanje protutijela za obilježavanje s 50  $\mu$ L protutijela za obilježavanje). U jažice se zatim dodalo po 100  $\mu$ L standardnog, kontrolnog i ispitivanog uzorka. Nakon toga se u svaku jažicu dodalo 100  $\mu$ L GLP-1 (7-36)&(9-36) mješavine protutijela. Pločica se pokrila poklopcem i uslijedilo je razdoblje inkubacije na 2-8 °C u mirovanju u razdoblju od 22 sata. Nakon inkubacije aspirirao se sadržaj jažica, a jažice su pet puta isprane s 350  $\mu$ L radne koncentrirane otopine za ispiranje. Zatim se dodalo 200  $\mu$ L supstrata TMB u svaku ispranu jažicu. Mikrotitarska pločica se pokrila s poklopcem i aluminijskom folijom te inkubirala u mraku u trajanju od 20 minuta. Na kraju je dodano 50  $\mu$ L STOP otopine. Lagano se promiješalo. Apsorpcija razvijene boje izmjerena je na valnoj duljini od 450 nm i referentnoj valnoj duljini od 620 nm. Nanošenjem apsorpcijskih vrijednosti kalibratora na ordinatu, a koncentracija ukupnog i aktivnog GLP-1 (pmol/l) na apscisu u linearnom koordinatnom sustavu dobiva se kalibracijska krivulja. S pomoću nje moguće je ovisno o očitanoj apsorpciji ispitivanih uzoraka očitati njihove GLP-1 vrijednosti.

#### 4.2.2.2. Glukagon

##### **Kemikalije i uzorci:**

1. Protutijelom (zečji anitglukagon) omotane mikrotitarske pločice (96 jažica)
2. STD- standard (sintetički glukagon)
3. Označeni antigen (biotinilirani glukagon)
4. SA-HRP otopina (HRP označeni streptoavidin)
5. Supstratni pufer
6. OPD (o-fenilenediamin dihidroklorid) tableta -kromogen
7. STOP- otopina za zaustavljanje reakcije

8. Pufer otopina A (fosfatni pufer sa serumom)
9. Pufer otopina B (fosfatni pufer)
10. Koncentrirana otopina za ispiranje
11. Folija za inkubaciju

**Instrument:** Spektrofotometrijski čitač mikrotitarskih pločica (STATFAX 2100)

**Postupak:**

- a) Priprema STD-** rekonstituirati STD-10 ng/posudici s 1 ml pufer otopine A (dobili 10000 pg/ml), zatim 0,5 ml te rekonstituirane otopine razrijedimo s 1 ml pufer otopine A- na taj način smo dobili 3,333 pg/ml standardne otopine; ponovili smo postupke u svrhu dobivanja koncentracije 1,111, 370, 123, 41 pg/ml; sam pufer A je nulta kontrola, 0 pg/ml;
- b) Priprema uzorka-** jednokratno su se odmrznuli na sobnu temperaturu;
- c) Priprema otopine označenog antigena-** rekonstituirali smo označeni antigen s 6 mL pufer otopine B;
- d) Priprema otopine supstrata-** otopili smo OPD tablete s 12 ml supstratnog pufera;
- e) Priprema otopine za ispiranje-** razrijedili smo 50 ml koncentrirane otopine za ispiranje do 1000 mL destilirane vode.

Svi reagensi i uzorci su otopljeni do sobne temperature. Dodali smo po 100  $\mu$ L STD i uzorka u svaku jažicu. Zatim smo odmah dodali po 50  $\mu$ L otopine označenog antigena u svaku jažicu. Potom smo prekrili folijom te inkubirali u trajanju od 22 sata. Nakon inkubacije aspirirao se sadržaj jažica, a jažice su tri puta isprane s 350  $\mu$ L otopine za ispiranje. Zatim se u svaku jažicu dodalo po 100  $\mu$ L SA-HRP otopine te se prekrilo folijom i inkubiralo na sobnoj temperaturi (20-30  $^{\circ}$ C) u trajanju od jednog sata (cijelo vrijeme na „shakeru“). Zatim se učinila radnja pod slovom „d“. Nakon inkubacije aspirirao se sadržaj jažica, a jažice su tri puta isprane s 350  $\mu$ L otopine za ispiranje. Zatim se dodalo po 100  $\mu$ L otopine supstrata koja sadrži OPD tablete u svaku jažicu, pokrilo folijom te se inkubiralo 20 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije dodalo se po 100  $\mu$ L otopine STOP. Apsorpcija razvijene boje izmjerena je na valnoj duljini

od 490 nm. Dobivene vrijednosti apsorpcije izražene su pomoću kalibracijske krivulje (semilogaritamski papir), kao koncentracija glukagona (pg/ml).

#### 4.2.2.3. FGF-21

##### **Kemikalije i uzorci:**

1. Protutijelom (poliklonalni anti-FGF-21) omotane mikrotitarske pločice (96 jažica)
2. Pufer za ispiranje
3. Pufer za analiziranje
4. Otopina za otkrivanje protutijela- A biotinom označeno poliklonalno protutijelo protiv ljudskog FGF-21
5. Liofilizirani ljudski FGF-21 standard u proteinskom matriksu- STD
6. Liofilizirani kontrola kvalitete- CTRL
7. STP-HRP otopina (streptavidin-HRP konjugat)
8. Supstratna otopina
9. STOP- otopina za zaustavljanje reakcije

**Instrument:** Spektrofotometrijski čitač mikrotitarskih pločica (STATFAX 2100)

##### **Postupak:**

- a) **Priprema pufera za analiziranje-** pomiješala se otopina za analiziranje 20 ml s 80 ml destilirane vode;
- b) **Priprema pufera za ispiranje-** pomiješala se otopina za ispiranje 50 ml s 450 ml destilirane vode;
- c) **Priprema otopine za otkrivanje protutijela-** kratko se centrifugirala otopina za otkrivanje protutijela, zatim se pomiješalo 0,12 mL otopine za otkrivanje protutijela s 11,88 mL pufera za analiziranje;
- d) **Priprema STP-HRP otopine-** kratko se centrifugirala te se dodalo 0,06 mL te otopine s 11,94 mL pufera za analiziranje;
- e) **Priprema kontrola-** rekonstituirala se CTRL s puferom za analiziranje te se 10 minuta ostavilo da stoji;
- f) **Priprema uzoraka-** nisu se razrjeđivali.

Dodali smo po 100  $\mu$ L STD, CTRL i uzorka u svaku jažicu te inkubirali na sobnoj temperaturu u trajanju od 1 sat. Zatim smo istresli sadržaj jažice na papir te dodali po 300  $\mu$ L pufera za ispiranje i inkubiralo 1 minutu. Ovaj

korak smo ponovili tri puta. Nakon toga smo dodali po 100 µL otopine za otkrivanje protutijela u svaku jažicu te inkubirali na sobnoj temperaturi sat vremena. Nakon toga se ponovio korak s ispiranjem 3 puta. Nakon toga se dodalo po 100 µL STP-HRP otopine u svaku jažicu te inkubiralo na sobnoj temperaturi 20 minuta. Nakon toga se ponovio korak s ispiranjem 4 puta. Iza toga se dodalo 100 µL supstratne otopine u svaku jažicu, pokrilo folijom te inkubiralo na sobnoj temperaturi 15 minuta. U svaku jažicu se zatim dodalo po 100 µL otopine STOP te nježno lupkalo po poklopcu da se pošteno izmiješa. Apsorpcija razvijene boje izmjerena je na valnoj duljini od 450 nm. Dobivene vrijednosti apsorpcije izražene su pomoću kalibracijske krivulje, kao koncentracija FGF-21 (pg/ml).

#### **4.2.3. Dijabetička nefropatija**

Postojanje dijabetičke nefropatije se procijenilo na temelju vrijednosti kreatinskog klirensa iz seruma, pomoću CKD EPI formule, te albumina u 24-h urinu (250-253). Formula CKD EPI glasi:  $141 \times \min(\text{Skr}/\kappa, 1)^\alpha \times \max(\text{Skr}/\kappa, 1)^{-1,209} \times 0,993^{\text{Dob}}$  x 1,018 [ako žensko] x 1,159 [ako crnac] (254). Skr označava kreatinin u serumu (mg/dL),  $\kappa=0,7$  za žene i 0,9 za muškarce,  $\alpha= -0,329$  za žene i  $-0,411$  za muškarce, min ukazuje na minimum od Scr/ $\kappa$  ili 1, a max ukazuje na maksimum od Scr/ $\kappa$  ili 1. Osobe koje su imale prosječnu albuminuriju od 2 uzorka 24- satnog urina veću od 30 mg/dU i/ili eGFR prema CKD EPI <60 ml/min/1,73m<sup>2</sup> su pripadali skupini osoba s dijabetičkom nefropatijom. Niti jedan ispitanik nije imao dijabetičku nefropatiju dokazanu biopsijom bubrega, odnosno nikomu nije učinjena ovakva pretraga. Dijagnoza dijabetičke nefropatije za potrebu ovog istraživanja nije ovisila o liječenju inhibitorima angiotenzin konvertaze (ACE- inhibitorima), koje je uzimalo 17 ispitanika sa ŠB.

#### **4.2.4. Dijabetička retinopatija**

Ispitivanje postojanja dijabetičke retinopatije se provodilo u specijaliziranoj oftalmološkoj ambulanti pomoću standardiziranog protokola (255-260). Standardnom oftalmološkom obradom ispitanicima je utvrđena vidna oština,

visina očnog tlaka te status prednjeg i stražnjeg segmenta oba oka. Po završetku pregleda napravljene su fotografije u boji očne pozadine oba oka.

#### **Oftalmološki pregled i pretrage:**

1. *Vidna oštrina (VO, centralna vidna oštrina; lat. visus oculi)* - bez korekcije i s najboljom korekcijom, ispitana je pomoću standardnih optotipa na udaljenosti od 6 metara (Snellenovi optotipi brojevi i optotipi slova), a izražena razlomkom i dekadskim sustavom, pri čemu  $6/6 = 1,0$  označava normalnu vidnu oštrinu. Slabovidnost (lat. *amblyopia*) se prema vidnoj oštini definira kao blaga: VO 0,8 - 0,4, srednja: VO 0,3 - 0,1 i teška slabovidnost: VO < 0,1 (255, 256).
2. *Intraokularni tlak (IOT)* - izmjeren je, nakon ukapavanja kapi lokalnog anestetika (0,4% novesine) i fluoresceina (0,5% fluorescein-Na), Goldmann aplanacijskim tonometrom (eng. *Goldmann applanation tonometer; GAT*). Prema smjernicama Europskog glaukenskog društva raspon normalnog očnog tlaka u odraslih osoba je između 10 i 21 mmHg (257).
3. *Pregled prednjeg segmenta oka* - obavljen je na biomikroskopu s procjepnom svjetiljkom (Topcon).
4. *Binokularni pregled očne pozadine*, nakon ukapavanja midrijatičkih kapi (0,5% tropicamid i 5% phenylephrine), obavljen je na istom biomikroskopu indirektnom oftalmoskopijom pomoću nekontaktnih leća (VOLK SuperField NC® i VOLK Super 66®) (258).
5. Nakon pregleda u midrijazi, *slikana je očna pozadina oba oka* na digitalnoj fundus kameri (Zeiss, VISUCAM) - 45° retinalna kolor fotografija dva standardna polja (makularno polje i disk/nazalno polje). Makularno polje - pozicionirano tako da se PNO nalazi na horizontalnom meridijanu nazalnog ruba slike, disk/nazalno polje - pozicionirano tako da se PNO nalazi na horizontalnom meridijanu 1 DD udaljena od temporalnog ruba slike (259, 260).

Promjene na očnoj pozadini su na osnovi retinalnih fotografija u boji analizirala i standardizirala dva oftalmologa - retinologa, a stupanj retinopatije određen je



prema EURODIAB standardu (259, 260). U slučajevima nesukladnosti nalaza u istraživanje je bio uključen i treći oftalmolog – retinolog, koji je postavio konačnu dijagnozu.

Ispitanici su nakon potpune oftalmološke obrade prema stupnju dijabetičke retinopatije određenom standardom EURODIAB, bili podijeljeni u tri ispitivane skupine. Nalaz na lošijem oku odredio je stupanj retinopatije i njegova obilježja su poslije korištena u daljnjem istraživanju i statističkoj obradi.

Skupina 1 obuhvaćala je ispitanike koji nisu imali znakove dijabetičke retinopatije.

Skupina 2 obuhvaćala je ispitanike s blagom i/ili umjereno teškom neproliferativnom dijabetičkom retinopatijom (NPDR).

Skupina 3 obuhvaćala je ispitanike s teškom/vrlo teškom NPDR i proliferativnom dijabetičkom retinopatijom (PDR) ili stanjem nakon prethodno učinjene laserske fotokoagulacije retine (ALFKG) i/ili intravitrealno liječenje triamcinolonom ili bevacizumabom.

#### **4.2.5. Dijabetička neuropatija**

Dijagnoza dijabetičke neuropatije postavljena je u specijaliziranoj neurološkoj ambulanti pomoću standardiziranog neurološkog pregleda (261, 262), a po potrebi i rezultata dodatnih neurofizioloških ispitivanja.

S obzirom na zahvaćeni dio živčanog sustava dijabetičke neuropatije se prema Dycku (261) dijele na:

- simetričnu neuropatiju (distalna senzorna ili senzomotorička polineuropatija, autonomna neuropatija, inzulinski neuritis),
- fokalnu i multifokalnu neuropatiju (neuropatije kranijalnih živaca, trunkalna radikuloneuropatija, proksimalna neuropatija, kompresivne neuropatije), te
- kombiniranu neuropatiju (simetrična+fokalna i multifokalna).

S obzirom na simptome i znakove dijabetička polineuropatija može biti:

Stupanj 0 = nema simptoma, kliničkih niti neurofizioloških znakova;

Stupanj 1 = prisutni su klinički znaci, bez simptoma;

Stupanj 2a = prisutni su klinički znaci i simptomi, bez značajnije slabosti mišića;

Stupanj 2b = prisutni su klinički znaci i simptomi, slabost mišića

tako da bolesnik ne može hodati po petama;

Stupanj 3 = vrlo naglašeni simptomi i klinički znakovi uznapredovalog oštećenja.

Temeljem rezultata zasebno su ispitanici s dijabetičkom polineuropatijom podijeljeni u 3 skupine:

Skupina 1 - ispitanici koji nisu imali znakove dijabetičke polineuropatije

Skupina 2 - ispitanici s prvim stupnjem dijabetičke polineuropatije

Skupina 3 - ispitanici s drugim stupnjem dijabetičke polineuropatije. Nijedan ispitanik nije imao treći stupanj dijabetičke polineuropatije.

### **Neurološki pregled i pretrage:**

1. Bolna simptomatologija kvantificirana je korištenjem vizualno-analogne skale boli.

2. *Neurološki pregled* provodio se standardiziranim postupkom ispitivanja osjeta (dodira, boli, vibracije te položaja i kretanja u prostoru), ispitivanja miotatskih refleksa te ispitivanja trofike i snage mišića. Osjet je ispitivan u ležećem položaju, zatvorenih očiju ispitanika, podraživanjem kože neposredno ispod nokta (distalna falanga) obaju nožnih palaca. Osjet dodira provociralo se laganim dodirnom pomoću smotuljka vate, nepravilnim slijedom, pri čemu su ispitanici odgovarali osjećaju li dodir ili ne. Osjet bola ispitivan je pribadačom s jednim zaobljenim vrhom. Naizmjeničnim podražajem iglenog ili zaobljenog dijela ispitanici su odgovarali je li dodir tup ili oštar. Osjet vibracije ispitivan je zatitralom vibracijskom vilicom frekvencije 128 Hz prilonjenom na gore navedno područje stopala. Ispitanici su trebali odrediti trenutak kada više ne osjećaju vibraciju. Usporedbom vibracije ispitanika i ispitivača dobiven je podatak o urednoj, skraćenoj ili odsutnoj vibraciji. Osjet položaja se ispitivao pomicanjem distalne falange palca pri čemu su ispitanici odgovarali osjećaju li pomak i u kojem smjeru. Od miotatskih refleksa ispitivani su refleksi m. quadriceps femoris i m. tricepsa surae. Trofika mišića ispitivana je palpacijom pojedinih mišića, a mišićna

snaga aktivnim pokretom prstiju stopala te cijelog stopala protiv otpora ispitivača.

2. *Elektroneurografija*- brzina motorne provodljivosti i visina amplitude M potencijala za n. peroneus i n. tibialis te brzina senzorne provodljivosti i visina amplitude neuralnog potencijala za n. suralis procijenjena je površinskim stimulacijskim i registracijskim elektrodama na oba donja ekstremiteta. Pri testiranju je korišten Dantec Keypoint standardni EMNG uređaj (Dantec Co, Skovlunde, Danska). Testiranje se provodilo pri temperaturi kože stopala iznad 30°C. Mjesta stimulacije i registracije su određena standardnom procedurom (262). Provodljivost motornih vlakana ispitivana je stimulacijom perifernog živca pomoću površinske elektrode (supramaksimalnom jačinom struje i trajanja 0,1 msec) postavljene iznad živca, čime se izazvala depolarizacija membrane živčanog vlakna. Nastali akcijski potencijal potom putuje duž živca, a dobiveni mišićni evocirani odgovor (M potencijal) registriran je na monitoru pomoću površinske elektrode postavljenje nad odgovarajućim mišićem. Senzorna brzina provodljivosti n. suralisa u proksimalnom segmentu (distalni dio potkoljenice) mjerena je antidromno. Provodljivost senzoričkih vlakana ispitana je stimulacijom n. suralisa površinskom stimulacijskom elektrodom (strujom od 20 do 40 mA i trajanja 0,1 msec) postavljenom iznad živca. Površinska registracijska elektroda postavljena distalnije nad istim živcem bilježila je evocirani živčani odgovor. Amplituda dobivenog M i neuralnog potencijala mjerena je u mV od osnovne crte do vrha negativne faze. Brzina motorne i senzoričke provodljivosti izračunata je iz dobivene latencije (vrijeme proteklo od trenutka podražaja do pojave evociranog potencijala) i udaljenosti elektroda, a izražena je u m/s. Dobivene vrijednosti uspoređene su s normalama, koje ovise o vrsti ispitivanog živca, visini ispitanika te temperaturi ekstremiteta. Za statističku obradu korišteni su podaci dobiveni ispitivanjem noge s većom amplitudom n. suralisa.

#### **4.3. Provedba istraživanja**

Na početku istraživanja ispitivanoj (ŠBT1) i zdravoj kontrolnoj skupini izmjerile su se koncentracije ukupnog i aktivnog GLP-1 natašte (0 minuta) i

postprandijalno (30 minuta nakon obroka budući da se tada očekuje najveći početni skok vrijednosti GLP-1) (75), zatim koncentracije glukagona natašte (0 minuta) i postprandijalno (30 minuta) te koncentracija FGF-21 natašte (0 minuta) i postprandijalno (30 minuta). Natašte se smatralo uzimanje uzoraka ujutro u ispitanika koji najmanje 8 sati nisu jeli, a dan ranije su večerali standardni dijabetički obrok. U sklopu prethodno predviđene dijagnostičke obrade uzeti su uzorci plazme natašte za mjerenje koncentracija kreatinina, C-peptida, ukupnog kolesterola, LDL kolesterola, HDL kolesterola, triglicerida, HbA1c te uzorci 24-satnog urina za mjerenje albuminurije. Ispitanici su doručkovali klasični standardni dijabetički obrok, čija je kalorijska vrijednost ovisila o TM ispitanika (324-538 kcal), a sastojala se od 70% šećera, 25% bjelancevina i 5% masti (srednja vrijednost trodnevne ankete prehrane). Nakon toga su se uzeli anamnestički podaci o trajanju ŠBT1 u godinama, navikama ispitanika, vrsti i količini dnevne doze inzulina te antihipertenzivnoj i antilipidemijskoj terapiji. Obavio se fizikalni pregled koji uključuje mjerenje TM i tjelesne visine, OS i OB, izračun ITM te mjerenje krvnog tlaka. Regulacija glikemije procijenila se pomoću postotka HbA1c. IR procijenila se pomoću vrijednosti eGDR. Postojanje dijabetičke nefropatije se procijenilo na temelju vrijednosti klirensa kreatinina u serumu pomoću CKD EPI formule te albumina u 24-h urinu. Dijabetička retinopatija i neuropatija su se dijagnosticirale na temelju specijalističkog pregleda i pretraga u specijaliziranim ordinacijama u sklopu Klinike.

#### **4.4. Statistička raščlamba podataka**

Statistička raščlamba podataka vršena je pomoću SPSS programa (verzija 15.0) i MedCalc kompjutorskog programa (verzija 12.4.0.0., Mariakerke, Belgija), postupcima ispitivanja razlika i povezanosti. Zbog male veličine uzorka koristila se neparametrijska statistika. Deskriptivna statistika numeričkih varijabli iskazana je medijanom kao mjerom srednje vrijednosti i rasponom kao mjerom varijabilnosti (minimum-maksimum). Nominalni pokazatelji prikazani su učestalošću, brojem i/ili postotkom. Razlike u numeričkim pokazateljima između dva nezavisna uzorka ispitane su pomoću Mann-Whitneyevog testa. Razliku u

numeričkim pokazateljima između više od dva nezavisna uzorka ispitali smo Kruskal-Wallis testom za neparametrijsku statistiku (s *post hoc* Mann-Whitneyevim testom). Razlike u numeričkim pokazateljima između dva zavisna uzorka ispitali smo Wilcoxonovim testom. Razlike u nominalnim pokazateljima (proporcijama) između dva uzorka ispitane su pomoću  $\chi^2$  testa (ili Fisherovog egzaktnog testa) i omjera rizika s 95% intervalom pouzdanosti. Razlike u nominalnim pokazateljima između više od dva uzorka ispitane su pomoću  $\chi^2$  testa. U testiranju hipoteze se koristio odgovarajući „*one-tailed test*“. Za neke varijable učinjene su i analize nakon podjele ispitanika u skupine s obzirom na referentne normalne vrijednosti, medijan vrijednosti pojedinih obilježja, ili vrijednost dobivenu ROC (eng. *receiver operating characteristics*) analizom (uz koju je optimalan odnos osjetljivosti i specifičnosti). U takvoj podjeli je ispitanik s vrijednošću diskriminantnog obilježja jednakom medijanu pripao skupini s manjom vrijednosti tog obilježja. Korelacije su ispitane pomoću Spearmanovog koeficijenta korelacije. U slučaju statistički značajnih linearnih korelacija odnos je prikazan linearnom regresijskom analizom. Prediktorne varijable su testirane multivarijatnom raščlambom pomoću binarne logističke regresije- Hosmer-Leveshow goodness-of-fit test. Odredio se odnos rizika (OR, prema eng. *odds ratio*) s 95% granicama pouzdanosti (CI, prema eng. *confidence intervals*). ROC analiza upotrijebljena je za određivanje praga vrijednosti eGDR (IO) za postojanje MS, te osjetljivosti i specifičnosti eGDR. Značajnost je prihvaćena na razini  $P < 0,05$ .

#### 4.5. Etička načela

Ovo istraživanje odobrilo je Etičko povjerenstvo Kliničke bolnice Merkur te Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Istraživanje je provedeno u skladu sa svim primjenjivim smjernicama čiji je cilj osigurati pravilno provođenje i sigurnost osoba koje su sudjelovale u ovom znanstvenom istraživanju uključujući Osnove dobre kliničke prakse, Helsinšku deklaraciju, Zakon o zdravstvenoj zaštiti Republike Hrvatske i Zakon o pravima pacijenata Republike Hrvatske.

## 5. REZULTATI

### 5.1. Opća, klinička i laboratorijska obilježja ispitanika sa ŠBT1

Tablica 3. prikazuje opća i klinička obilježja 30 ispitanika sa ŠBT1. Nešto veći broj ispitanika je muškog spola (53%), medijana dobi 37 godina, od 20 do 59, a medijana trajanja ŠBT1 22 godine, od 3 do 45. Medijan ITM iznosio je 24 kg/m<sup>2</sup>, od 20 do 30. Doručak od 324 kcal dobilo je 14 (47%) ispitanika, od 396 kcal 7 (23%) ispitanika, od 433 kcal 6 (20%) ispitanika, dok je 3 (10%) ispitanika doručkovalo 538 kcal. Svi su ispitanici bili na intenziviranoj inzulinskoj terapiji. Medijan ukupne doze inzulina iznosi 0,6 IU/kg/dan u rasponu od 0,32 do 0,94. Od toga na ukupnu dozu bazalnog inzulina otpada 0,27 IU/kg/dan (0,12-0,43), a na ukupnu dozu bolus inzulina 0,32 IU/kg/dan (0,17-0,58). Od moguće dvije vrste bazalnog inzulina, 70% ispitanika koristilo je inzulin glargin, dok je ostatak ispitanika dobivalo inzulin detemir. Od moguće tri vrste kratkodjelujućeg inzulina, najviše je ispitanika, 50%, koristilo inzulin aspart, 40% inzulin lispro, dok je samo 10% koristilo inzulin glulizin. Medijan sistoličkog krvnog tlaka je iznosio 120 (100-160) mmHg, a dijastoličkog krvnog tlaka 80 (70-100) mmHg. 37% ispitanika je imalo dijagnozu povišenog krvnog tlaka, dok je 57% dobivalo anitipertenzivnu terapiju, a svi od tih 57% su imali ACE- inhibitor u terapiji. Cigarete je konzumiralo 37% ispitanika, a nitko alkohol. Uz ŠBT1, prisutnost neke druge bolesti je iznosila 77% (povišen krvni tlak, dislipidemija, bolesti štitnjače, problemi s kralježnicom, kožne bolesti, probavne bolesti, benigne bolesti dojke, poremećaji srčanog ritma, psihičke bolesti). 9 osoba je imalo statin u terapiji.

Na Slikama 3.-7. prikazana je učestalost mikrovaskularnih komplikacija. Dijabetičku nefropatiju je imalo 5 osoba (17%) (Slika 3.). Dijabetička retinopatija se klasificirala u 3 stupnja; 14 osoba nije imalo retinopatiju (47%), 5 osoba je imalo blagu ili umjereno tešku NPDR (17%), dok je 11 osoba (36%) imalo tešku ili vrlo tešku NPDR ili PDR, ili je imalo ranije učinjenu ALFKG i/ili intravitrealnu terapiju triamcinolonom ili bevacizumabom (Slika 4.). Dijabetička neuropatija je bila prisutna u 22 osobe (73%). Simetričnu neuropatiju je imalo 18 osoba, izoliranu fokalnu i multifokalnu niti jedna osoba, a kombiniranu neuropatiju 4

osobe (Slika 5.). Daljnjom klasifikacijom na DPN, izoliranu fokalnu ili multifokalnu neuropatiju te autonomnu neuropatiju dobili smo slijedeće rezultate. Osmero osoba nije imalo DPN, 12 je imalo početni ili 1. stupanj DPN, a 10 osoba 2. stupanj DPN (Slika 6.). Fokalnu ili multifokalnu neuropatiju je imalo 4 osobe (Slika 7.). Prisutnost autonomne neuropatije nije bila ispitana u 24 osoba, 2 osobe su imale autonomnu neuropatiju dok 4 osobe nisu imale. Od svih mikrovaskularnih komplikacija 4 nije imalo niti jednu mikrovaskularnu komplikaciju, 12 je imalo samo jednu mikrovaskularnu komplikaciju, 11 dvije, a 3 osoba je imalo sve 3 prisutne mikrovaskularne komplikacije (Slika 8.).

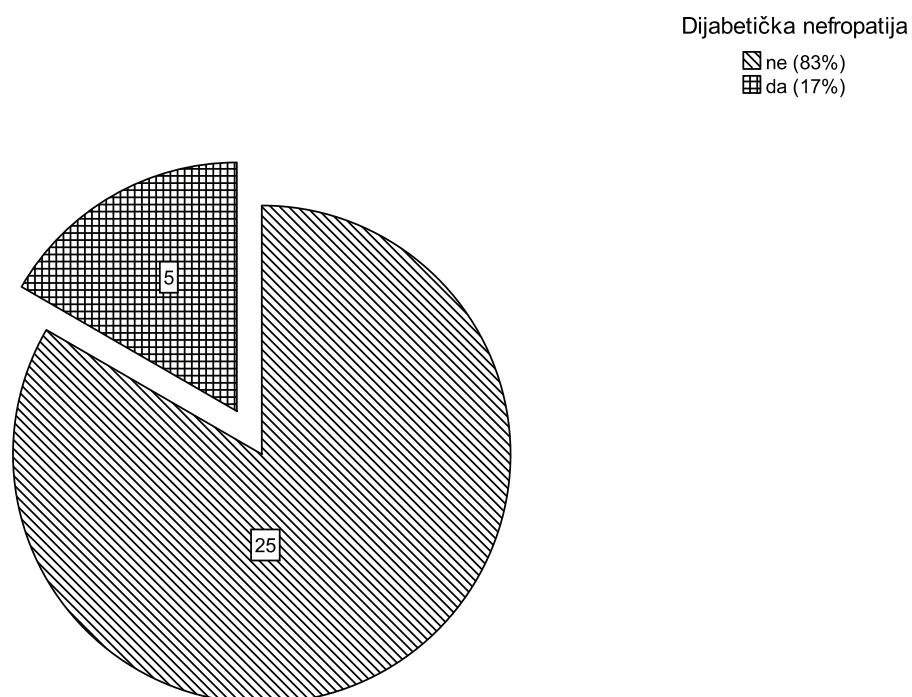
**Tablica 3. Opća i klinička obilježja 30 ispitanika sa šećernom bolešću tipa 1.**

<b>Varijabla</b>	<b>Vrijednost varijable</b>
<b>N</b>	<b>30</b>
Dob (godine)	37 (20-59)
Spol n (%)	
Muškarci	16 (53)
Žene	14 (47)
Trajanje ŠBT1* (godine)	22 (3-45)
TM† (kg)	69 (55-99)
ITM‡ (kg/m²)	24 (20-30)
OS§ (cm)	81 (68-100)
OB¶ (cm)	98 (84-107)
OS/OB¶	0,86 (0,72-0,97)
Kalorije za doručak (kcal) n (%)	
324	14 (47)
396	7 (23)
433	6 (20)
538	3 (10)
Inzulin	
Ukupna dnevna doza (IU/dan)	42 (21-66)
Ukupna dnevna doza (IU/kg/dan)	0,6 (0,32-0,94)
Vrsta bazalnog inzulina n (%)	
Inzulin detemir	9 (30)
Inzulin glargin	21 (70)
Dnevna doza bazalnog (IU/dan)	18 (8-36)
Dnevna doza bazalnog (IU/kg/dan)	0,27 (0,12-0,43)

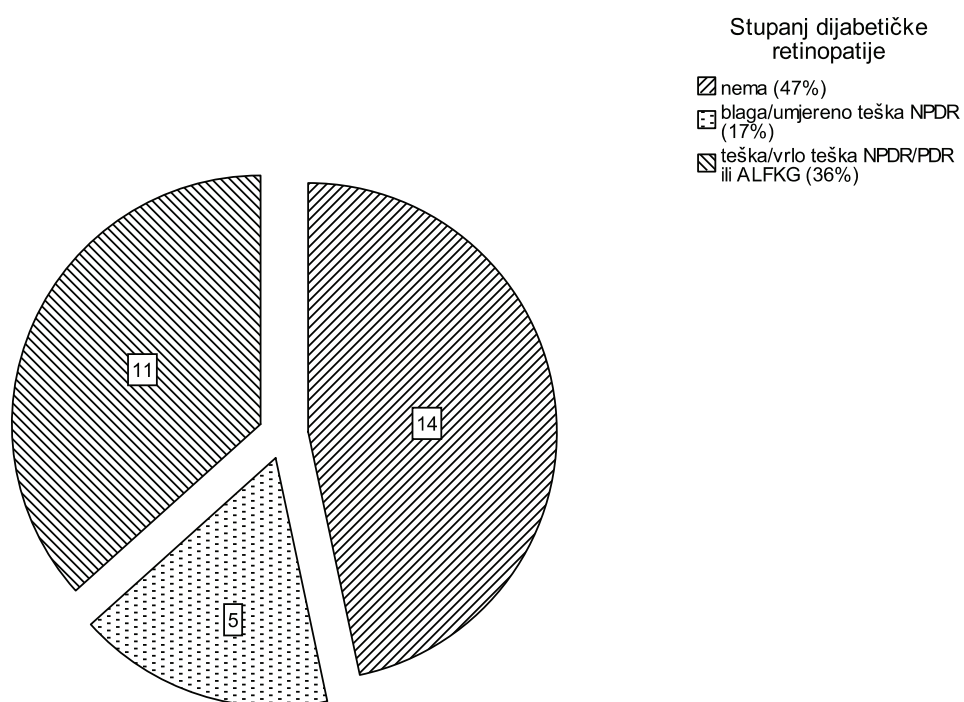
Vrsta bolus inzulina n (%)	
Inzulin aspart	15 (50)
Inzulin glulizin	3 (10)
Inzulin lispro	12 (40)
Dnevna doza bolus (IU/dan)	23 (12-40)
Dnevna doza bolus (IU/kg/dan)	0,32 (0,17-0,58)
Krvni tlak (mmHg)	
sistolički	120 (100-160)
dijastolički	80 (70-100)
Povišen krvni tlak n (%)	11 (37)
ACE inhibitor n (%)	17 (57)
Pušenje n (%)	11 (37)
Alkohol n (%)	0 (0)
Ostale bolesti n (%)	23 (77)
Ostala terapija n (%)	13 (43)
Statin n (%)	9 (30)

\*ŠBT1- šećerna bolest tipa 1; †TM- tjelesna masa; ‡ITM- indeks tjelesne mase; §OS- opseg struka; ||OB- opseg bokova; ¶OS/OB- omjer opsega struka i bokova; \*\*ACE inhibitor- inhibitor angiotenzin konvertaze.

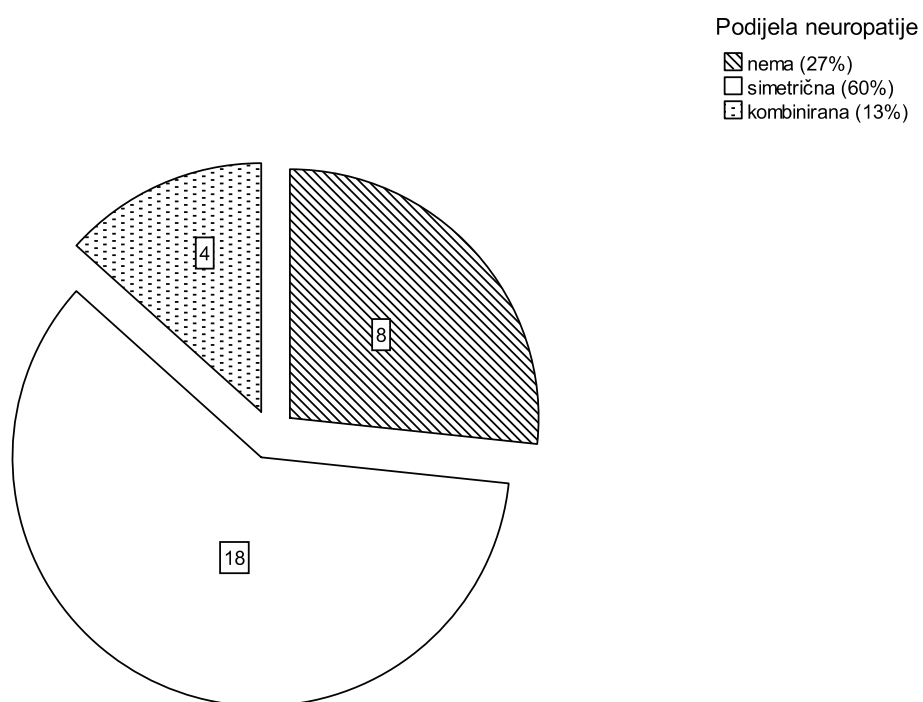




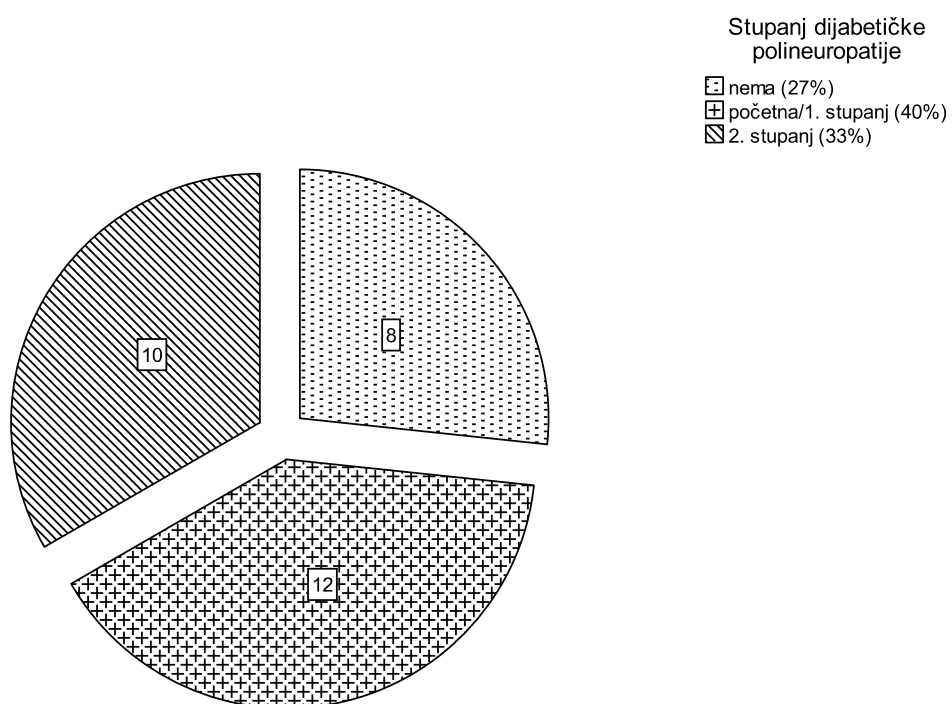
Slika 3. Učestalost dijabetičke nefropatije (N=30). Brojevi unutar dijelova pite prikazuju broj ispitanika.



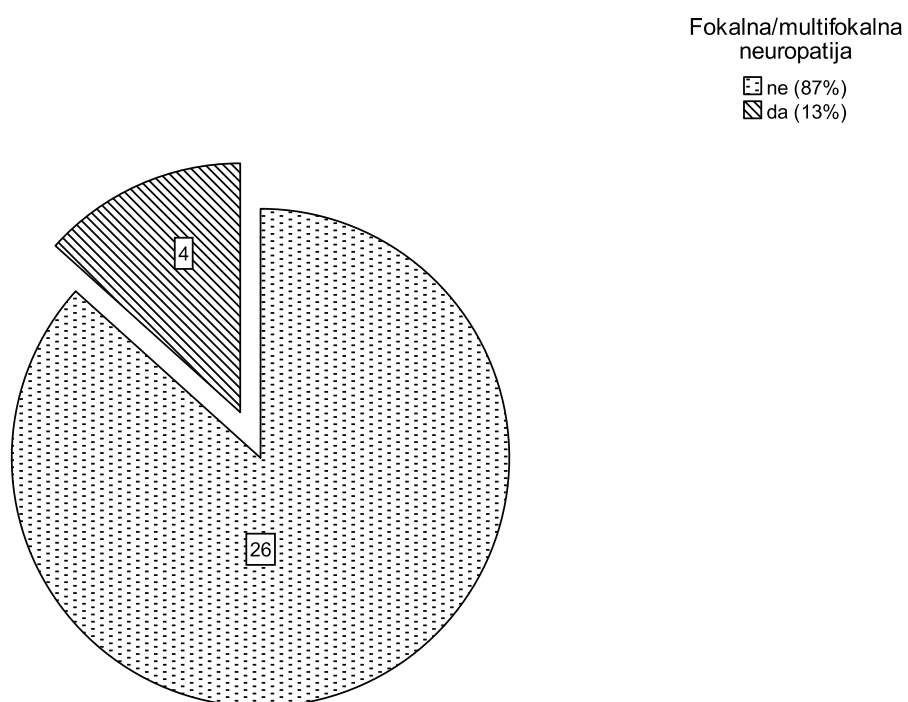
Slika 4. Učestalost dijabetičke retinopatije (N=30). Brojevi unutar dijelova pite prikazuju broj ispitanika. NPDR- neproliferaivna dijabetička retinopatija; PDR- proliferativna dijabetička retinopatija; ALFKG- laserska fotokoagulacija mrežnice.



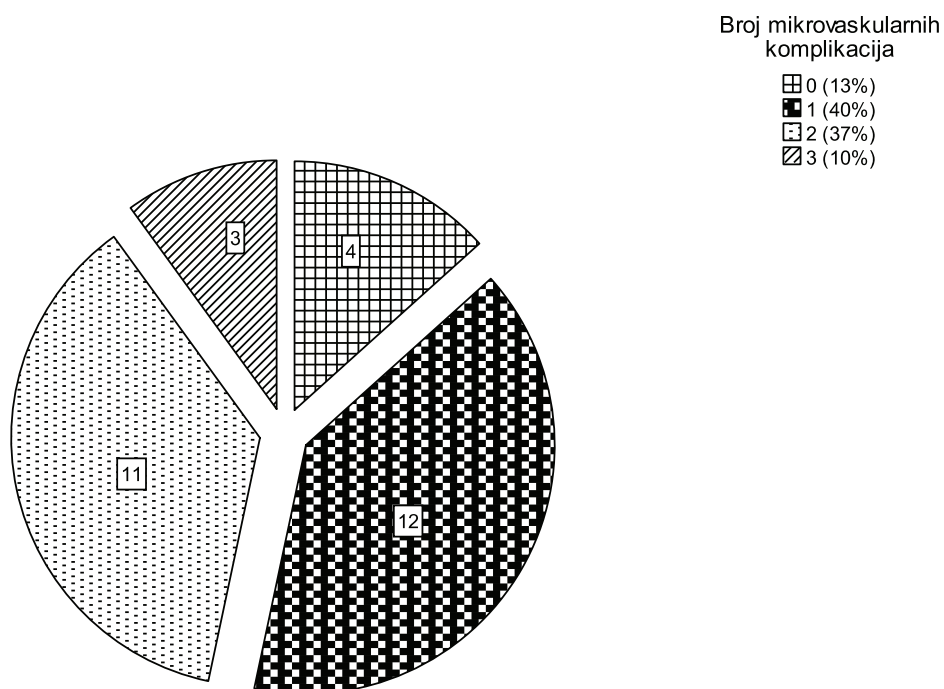
Slika 5. Učestalost dijabetičke neuropatije (N=30). Brojevi unutar dijelova pite prikazuju broj ispitanika.



Slika 6. Učestalost dijabetičke polineuropatije (N=30). Brojevi unutar dijelova pite prikazuju broj ispitanika.



Slika 7. Učestalost fokalne/multifokalne neuropatije (N=30). Brojevi unutar dijelova pite prikazuju broj ispitanika.



Slika 8. Učestalost mikrovaskularnih komplikacija (N=30). Brojevi unutar dijelova pite prikazuju broj ispitanika.

Tablica 4. prikazuje laboratorijska obilježja 30 ispitanika sa ŠBT1. Glikemija natašte (GUP 0') iznosila je 6,9 mmol/l (2,5-13,1), a u 30- minuti (GUP 30') 10,2 mmol/l (2,7-16,3). HbA1c u postocima iznosio je 7,2% (5,1-12,4), odnosno u SI jedinicama 56 mmol/mol (33-110). Istraživanje je obuhvatilo skupinu ispitanika bez ostatne endogene sekrecije inzulina, medijan vrijednosti C-peptida natašte i postprandijalno, u 30-minuti je iznosio 0 nmol/l. Ukupno je samo 3 ispitanika imalo uopće mjerljivu vrijednost C-peptida (veću od nule), ali nedovoljno visoku (ispod donje referentne granične vrijednosti) da bismo endogenu rezervu inzulina smatrali očuvanom. Mjerena je vrijednost ICA, GAD i IA-2 protutijela. 13% ispitanika u vrijeme provođenja istraživanja imalo je negativnu vrijednost ICA, 23% graničnu pozitivnu vrijednost, a 64% pozitivna ICA protutijela. 33% osoba je u tom trenutku imalo negativna GAD protutijela, dok je 70% njih imalo negativna IA-2 protutijela. Medijan koncentracije kreatinina iznosio je 66  $\mu$ mol/l (43-88), CKD EPI 112 ml/min (77-133), albuminurije 7,3 mg/dU (3,2-69,7).

Medijan vrijednosti jetrenih enzima iznosio je: AST 23 U/l (15-55), ALT 21 U/l (10-58), GGT 19 U/l (11-93). Lipidogram je pokazao sljedeće vrijednosti (sve u mmol/l): ukupni kolesterol 5 (3,7-7,6), HDL kolesterol 1,6 (1-2,6), HDL2 kolesterol 0,5 (0,3-0,8), HDL3 kolesterol 1,1 (0,6-1,8), LDL kolesterol 2,9 (1,9-5), kolesterol vrlo male gustoće (od eng. *very low density lipoprotein cholesterol*) VLDL kolesterol 0,4 (0,2-1), te trigliceridi 0,9 (0,4-2,2). IR je procijenjena izračunavanjem eGDR. Medijan vrijednosti eGDR iznosio je 8,8 mg/kg/min (3,7-11,3).

**Tablica 4. Laboratorijska obilježja 30 ispitanika sa šećernom bolešću tipa 1.**

Varijabla	Vrijednost varijable
N	30
GUP <sup>+</sup> (mmol/l)	
0'	6,9 (2,5-13,1)
30'	10,2 (2,7-16,3)
HbA1c <sup>+</sup>	
%	7,2 (5,1-12,4)
mmol/mol	56 (33-110)
C- peptid (nmol/l)	
0'	0 (0-0,11)
30'	0 (0-0,35)
ICA <sup>+</sup> protutijela n (%)	
0 (negativna)	4 (13)
0,5 (granično pozitivna)	7 (23)
1-5 (pozitivna)	19 (64)
GAD <sup>s</sup> (IU/ml) protutijela n (%)	
0-10 (negativna)	13 (33)
>10 (pozitivna)	17 (57)
IA-2 <sup>  </sup> (IU/ml) protutijela n (%)	
0-15 (negativna)	21 (70)
>15 (pozitivna)	9 (30)
Leukociti (*10 <sup>9</sup> /l)	6,6 (3,1-10,9)
Hemoglobin (g/l)	142 (119-162)
Trombociti (*10 <sup>9</sup> /l)	263 (172-385)
Feritin (µg/l)	73 (7-281)
Urati (µmol/l)	240 (147-341)
Urea (mmol/l)	5,8 (2,2-8,3)

Kreatinin ( $\mu\text{mol/l}$ )	66 (43-88)
Bilirubin ( $\mu\text{mol/l}$ )	14 (5-27)
Alkalna fosfataza (U/l)	87 (52-135)
AST <sup>†</sup> (U/l)	23 (15-55)
ALT <sup>**</sup> (U/l)	21 (10-58)
GGT <sup>††</sup> (U/l)	19 (11-93)
Laktat dehidrogenaza (U/l)	162 (132-214)
Kreatin kinaza (U/l)	114 (47-527)
CRP <sup>‡‡</sup> (mg/l)	1 (0,1-7,2)
Kolesterol (mmol/l)	
Ukupni	5 (3,7-7,6)
HDL <sup>§§</sup>	1,6 (1-2,6)
HDL2	0,5 (0,3-0,8)
HDL3	1,1 (0,6-1,8)
LDL <sup>   </sup>	2,9 (1,9-5)
VLDL <sup>†††</sup>	0,4 (0,2-1)
LDL/HDL	1,8 (1,2-3,2)
ne-HDL	3,37 (2,28-5,97)
Trigliceridi (mmol/l)	0,9 (0,4-2,2)
TSH <sup>****</sup> (mU/l)	2,1 (0,6-4,9)
fT3 <sup>†††</sup> (pmol/l)	5 (3,5-6,9)
fT4 <sup>†††</sup> (pmol/l)	14,7 (9,8-17,8)
eGDR <sup>§§§</sup> (mg/kg/min)	8,8 (3,7-11,3)
Trigliceridi/HDL	0,62 (0,2-1,99)
CKD EPI <sup>    </sup> (ml/min)	112 (77-133)
albuminurija (mg/dU)	7,3 (3,2-69,7)

<sup>†</sup>GUP- glikemija u plazmi, <sup>†</sup>HbA1c- glikirani hemoglobin, <sup>†</sup>ICA- protutijela na  $\beta$ -stanicu gušterače, <sup>§</sup>GAD- protutijela na dekarboksilazu glutaminske kiseline, <sup>||</sup>IA-2- protutijela protein 2 udružena s inzulinomom, <sup>††</sup>AST- aspartat aminotransferaza, <sup>\*\*</sup>ALT- alanin aminotransferaza, <sup>††</sup>GGT-  $\gamma$ -glutamil transpeptidaza, <sup>‡‡</sup>CRP- C-reaktivni protein, <sup>§§</sup>HDL- kolesterol visoke gustoće, <sup>|||</sup>LDL- kolesterol male gustoće, <sup>†††</sup>VLDL- kolesterol vrlo male gustoće, <sup>\*\*\*\*</sup>TSH- tireotropin, <sup>†††</sup>fT3- slobodni trijodtironin, <sup>†††</sup>fT4- slobodni tiroksin, <sup>§§§</sup>eGDR- prosječna stopa raspoložive glukoze, <sup>||||</sup>CKD EPI- eng. *Chronic Kidney Disease Epidemiology* formula.

## 5.2. Opća, klinička i laboratorijska obilježja zdravih kontrolnih ispitanika

Tablica 5. prikazuje opća, klinička i laboratorijska obilježja 10 zdravih kontrolnih ispitanika. Četvero ispitanika je bilo muškog spola, medijana dobi 30 godina



(27-47), a ITM 25 kg/m<sup>2</sup> (21-27). Koncentracija GUP 0' je iznosila 5,2 mmol/l (4,3-5,8), a vrijednost HbA1c 5,2% (4,3-5,8). Medijan kreatininemije iznosio je 70 µmol/l (43-114), AST 22 U/l (13-35), ALT 17 U/l (10-40) i GGT 16 U/l (8-22). U lipidogramu medijan vrijednosti ukupnog kolesterola bio je 4,7 mmol/l (3,8-6,2), HDL kolesterola 1,5 mmol/l (1-2,2), LDL kolesterola 2,9 mmol/l (1,9-4,4) te triglicerida 0,8 mmol/l (0,6-2,1).

**Tablica 5. Opća, klinička i laboratorijska obilježja 10 zdravih kontrolnih ispitanika.**

<b>Varijabla</b>	<b>Vrijednost varijable</b>
<b>N</b>	<b>10</b>
Dob (godine)	30 (27-47)
Spol n (%)	
Muškarci	4 (40)
Žene	6 (60)
ITM* (kg/m <sup>2</sup> )	25 (21-27)
GUP <sup>†</sup> natašte (mmol/l)	5,2 (4,3-5,8)
HbA1c <sup>‡</sup>	
%	5,2 (4,3-5,8)
mmol/mol	34 (31-38)
Leukociti (*10 <sup>9</sup> /l)	6,8 (5,1-8,3)
Hemoglobin (g/L)	138 (120-165)
Trombociti (*10 <sup>9</sup> /L)	245 (175-324)
Urea (mmol/l)	4,3 (3,5-9,4)
Kreatinin (µmol/l)	70 (43-114)
AST <sup>§</sup> (U/L)	22 (13-35)
ALT <sup>  </sup> (U/L)	17 (10-40)
GGT (U/L)	16 (8-22)
Kolesterol (mmol/l)	
Ukupni	4,7 (3,8-6,2)
HDL <sup>¶</sup>	1,5 (1-2,2)
LDL <sup>**</sup>	2,9 (1,9-4,4)
Trigliceridi (mmol/l)	0,8 (0,6-2,1)

\* ITM- indeks tjelesne mase, <sup>†</sup>GUP- glukoza u plazmi, <sup>‡</sup>HbA1c- glikirani hemoglobin, <sup>§</sup> AST- aspartat aminotransferaza, <sup>||</sup> ALT- alanin aminotransferaza, <sup>¶</sup> HDL- kolesterol visoke gustoće, <sup>\*\*</sup> LDL- kolesterol male gustoće.

### 5.3. Povezanost GLP-1 s regulacijom glikemije, lipidemijom i mikrovaskularnim komplikacijama u ispitanika sa ŠBT1

#### 5.3.1. GLP-1 u plazmi i regulacija glikemije

Tablica 6. prikazuje povezanost koncentracija GLP-1 (uGLP-1 i aGLP-1) s regulacijom glikemije u ispitanika sa ŠBT1. Statistička značajna negativna povezanost je nađena između uGLP-1 0' s GUP 0',  $\rho=-0,498$ ,  $P=0,003$  te između uGLP-1 30' s GUP 0',  $\rho=-0,328$ ,  $P=0,039$ .

Linearna regresija je pokazala statistički značajnu neovisnu povezanost između uGLP-1 0' s GUP 0',  $P=0,034$ ,  $R^2=0,388$  ( $\text{uGLP-1 } 0'=3,222-0,274 \cdot \text{GUP } 0'$ ) (Slika 9).

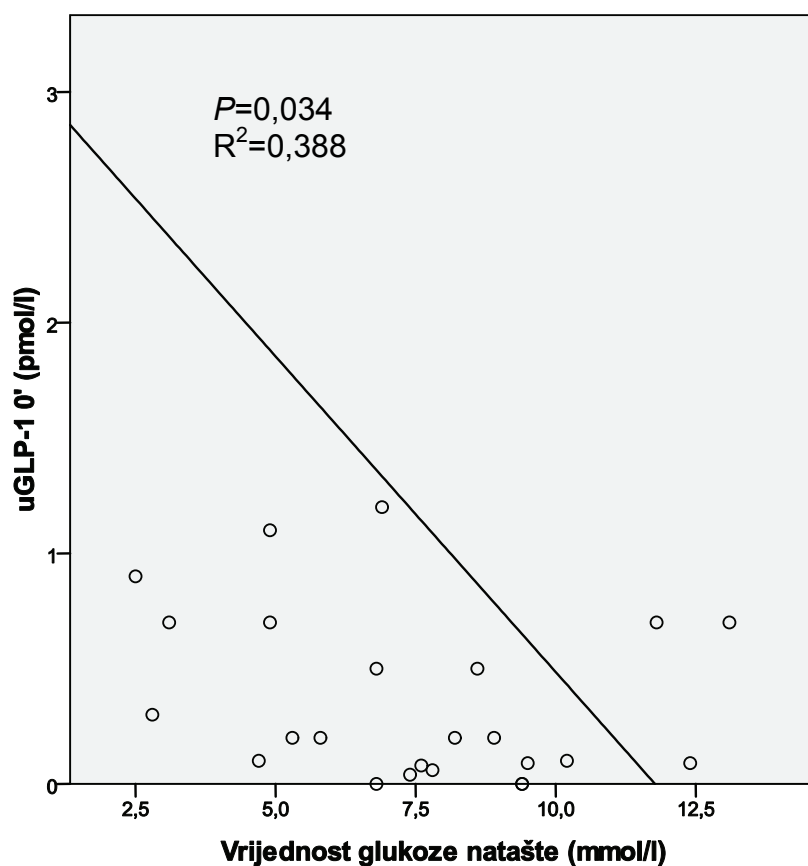
Nije nađena statistički značajna korelacija aGLP-1 u 0' ni u 30' s regulacijom glikemije (HbA1c postotno i u mmol/mol, GUP u 0' i u 30').

**Tablica 6. Povezanost peptida 1 sličnog glukagonu (GLP-1) s regulacijom glikemije u ispitanika sa šećernom bolesti tipa 1 (ŠBT1); N=30; Spearmanov one-tailed test.**

Variable u korelaciji	Koeficijent korelacije ( $\rho$ )	<i>P</i>
<b>uGLP-1 0'</b>		
<b>GUP<sup>†</sup> 0'</b>	<b>-0,489</b>	<b>0,003</b>
GUP 30'	-0,156	0,205
$\Delta\text{GUP}^\ddagger$	0,119	0,266
HbA1c <sup>§</sup> (%)	0,064	0,368
HbA1c (mmol/mol)	0,04	0,418
<b>uGLP-1 30'</b>		
<b>GUP 0'</b>	<b>-0,328</b>	<b>0,039</b>
GUP 30'	0,167	0,189
$\Delta\text{GUP}$	0,291	0,059
HbA1c (%)	-0,019	0,461
HbA1c (mmol/mol)	-0,036	0,426
<b>aGLP-1<sup>  </sup> 0'</b>		
GUP 0'	-0,15	0,215
GUP 30'	-0,206	0,137
$\Delta\text{GUP}$	-0,1	0,299
HbA1c (%)	0,154	0,208
HbA1c (mmol/mol)	0,16	0,2
<b>aGLP-1 30'</b>		

GUP 0'	-0,013	0,472
GUP 30'	0,003	0,493
$\Delta$ GUP	-0,054	0,388
HbA1c (%)	0,187	0,162
HbA1c (mmol/mol)	0,186	0,163

\*uGLP-1- ukupni peptid 1 sličan glukagonu, †GUP- glukoza u plazmi, ‡ $\Delta$ GUP- razlika između GUP 30' i GUP 0', §HbA1c- glikirani hemoglobin, || aGLP-1- aktivni peptid 1 sličan glukagonu.



Slika 9. Povezanost bazalne koncentracije ukupnog peptida 1 sličnog glukagonu (uGLP-1 0') s glikemijom natašte, linearna regresija.

Tablica 7. prikazuje odnos zavisne varijable uGLP-1 0' i GUP 0' u multiploj linearnoj regresiji standardiziranoj za dob, ITM i trajanje ŠBT1 (multivarijatna analiza). Koncentracija uGLP-1 0' neovisno o navedenim varijablama negativno korelira s GUP 0'.

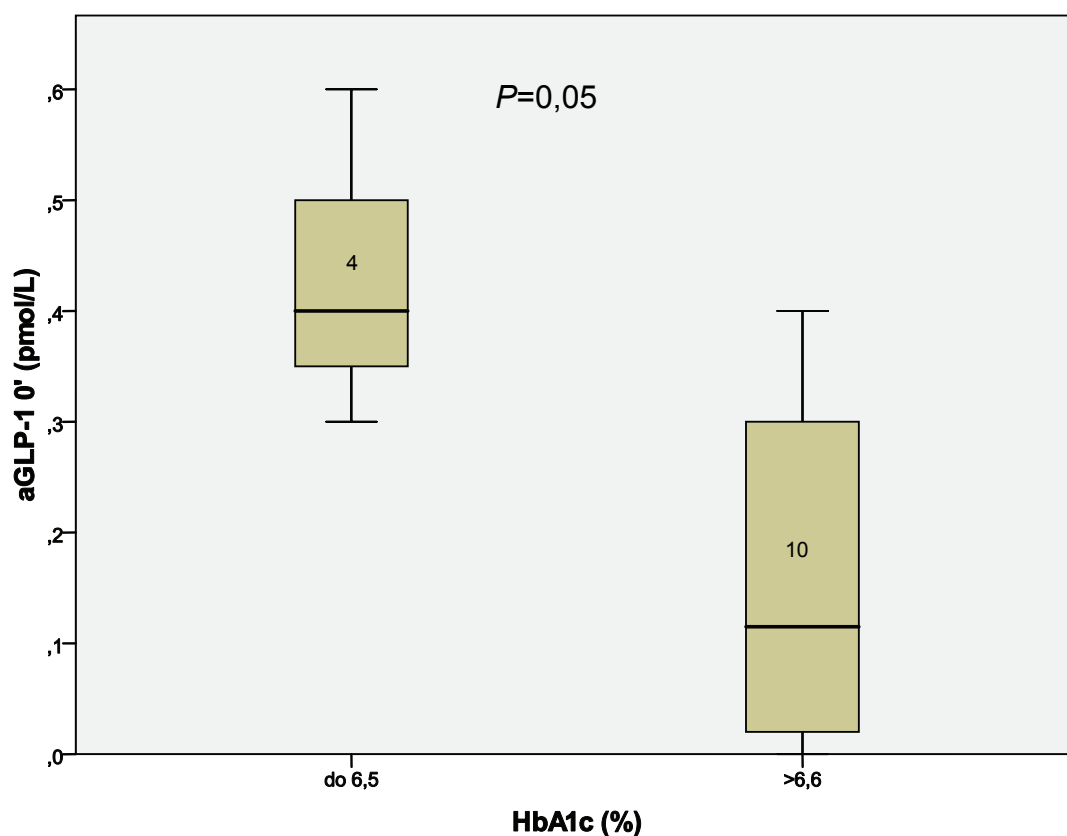
**Tablica 7. Multipla linearna regresija standardizirana za dob, ITM<sup>†</sup> i trajanje ŠB<sup>‡</sup> odnosa zavisne varijable uGLP-1 0' i glikemije natašte.**

<b>Varijabla</b>	<b>Koeficijent beta</b>	<b>P</b>
<b>GUP 0'<sup>§</sup></b>	<b>-0,454</b>	<b>0,019</b>
Dob	-0,059	0,79
ITM	-0,014	0,939
Trajanje ŠBT1 <sup>  </sup>	-0,263	0,24

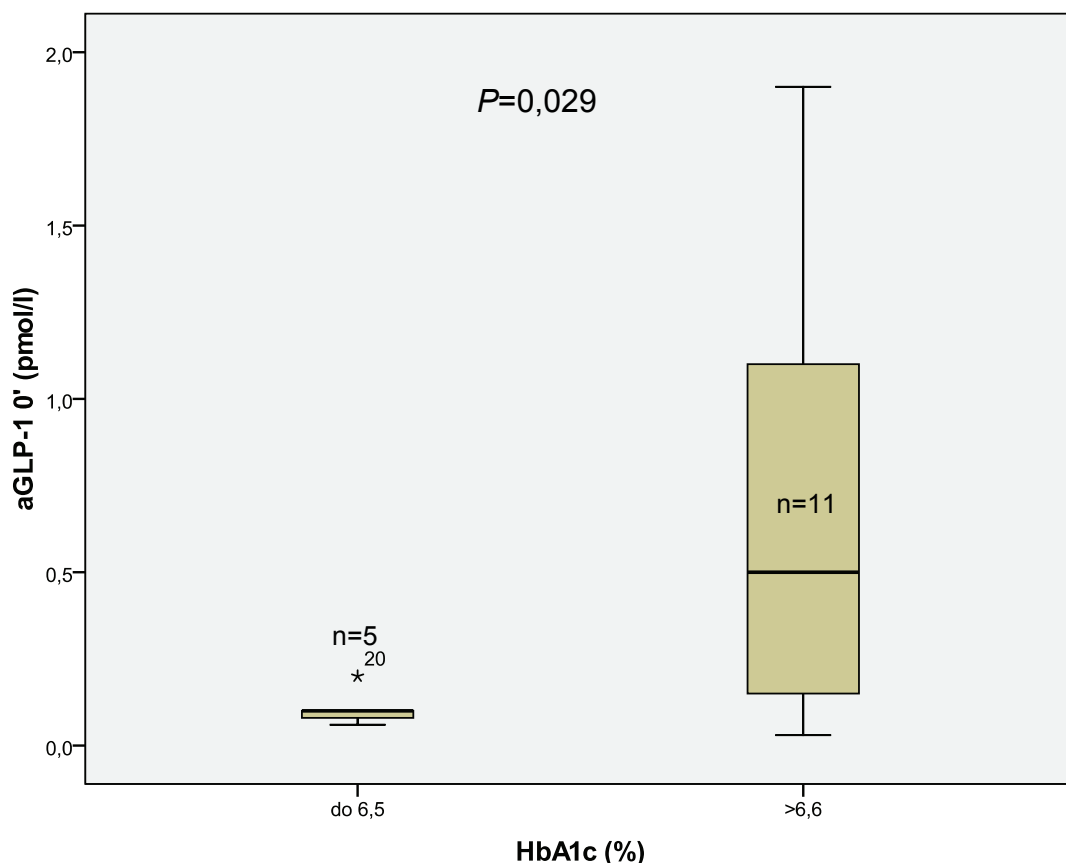
\*zavisna varijabla: uGLP-1 0'- ukupni bazalni peptid 1 sličan glukagonu. <sup>†</sup>ITM- indeks tjelesne mase, <sup>‡</sup>ŠB- šećerna bolest, <sup>§</sup>GUP 0'- glukoza u plazmi natašte, <sup>||</sup>ŠBT1- šećerna bolest tipa 1.

### 5.3.1.1. GLP-1 i regulacija glikemije s obzirom na spol

U oba spola nađena je statistički značajna razlika u koncentraciji aGLP-1 0' između 2 skupine ispitanika podijeljenih s obzirom na referentnu normalnu vrijednost HbA1c (6,5%). Žene koje imaju odličnu regulaciju imaju veću koncentraciju aGLP-1 0' u odnosu na žene s lošijom regulacijom glikemije (0,4 pmol/l, od 0,3 do 0,6 vs 0,12 pmol/l, od 0 do 0,4;  $z=-1,963$ ,  $P=0,05$ ) (Slika 10.). Muškarci s odličnom regulacijom glikemije ( $\leq 6,5\%$ ) imaju manju koncentraciju aGLP-1 0' u odnosu na muškarce s lošijom regulacijom glikemije (0,1 pmol/l, od 0,06 do 0,2 vs 0,5 pmol/l, od 0,03 do 1,9;  $z=-2,178$ ,  $P=0,029$ ) (Slika 11.).



Slika 10. Razlika u bazalnoj koncentraciji aktivnog peptida 1 sličnog glukagonu (aGLP-1 u 0') između žena (n=14) s odličnom i lošijom regulacijom glikemije (s obzirom na referentni normalan glikirani hemoglobin (HbA1c)).



Slika 11. Razlika bazalne koncentracije aktivnog peptida 1 sličnog glukagonu (aGLP-1 u 0') između muškaraca (n=16) s odličnom i lošijom regulacijom glikemije (s obzirom na referentni normalan glikirani hemoglobin (HbA1c)).

Nisu nađene statistički značajne razlike u vrijednostima drugih hormona u pojedinačnim skupinama žena i muškaraca s obzirom na navedene podjele prema HbA1c.

### 5.3.2. GLP-1 u plazmi i vrijednosti lipida

Tablica 8. prikazuje povezanost koncentracija GLP-1 s lipidemijom u ispitanika sa ŠBT1. Ukupni GLP-1 u 0' negativno korelira s ukupnim kolesterolom, iako nedovoljno statistički značajno ( $\rho=-0,248$ ,  $P=0,093$ ) te statistički značajno negativno s HDL kolesterolom ( $\rho=-0,328$ ,  $P=0,038$ ). Statistički značajna negativna povezanost nađena je između uGLP-1 u 30' s ukupnim kolesterolom ( $\rho=-0,42$ ,  $P=0,01$ ), HDL kolesterolom ( $\rho=-0,423$ ,  $P=0,01$ ) te LDL kolesterolom ( $\rho=-0,337$ ,  $P=0,035$ ). Statistički značajna negativna povezanost nađena je

između aGLP-1 0' i HDL3 kolesterola ( $\rho=-0,367$ ,  $P=0,023$ ) te između aGLP-1 u 30' i ukupnog ( $\rho=-0,439$ ,  $P=0,008$ ), HDL ( $\rho=-0,4$ ,  $P=0,014$ ), i LDL kolesterola ( $\rho=-0,352$ ,  $P=0,028$ ).

**Tablica 8. Povezanost peptida 1 sličnog glukagonu s lipidemijom u ispitanika sa šećernom bolesti tipa 1 (N=30; Spearmanov one tailed test).**

<b>Varijable u korelaciji</b>	<b>Koeficijent korelacije (<math>\rho</math>)</b>	<b>P</b>
<b>uGLP-1 0'</b>		
<i>Ukupni kolesterol</i>	-0,248	0,093
<b>HDL<sup>†</sup> kolesterol</b>	<b>-0,328</b>	<b>0,038</b>
HDL2 kolesterol	-0,092	0,314
<b>HDL3 kolesterol</b>	<b>-0,314</b>	<b>0,046</b>
LDL <sup>‡</sup> kolesterol	-0,17	0,185
VLDL <sup>§</sup> kolesterol	0,107	0,286
Trigliceridi	0,104	0,293
LDL/HDL kolesterol	0,091	0,316
ne-HDL kolesterol	-0,167	0,19
<b>uGLP-1 30'</b>		
<b>Ukupni kolesterol</b>	<b>-0,42</b>	<b>0,01</b>
<b>HDL kolesterol</b>	<b>-0,423</b>	<b>0,01</b>
<i>HDL2 kolesterol</i>	-0,273	0,072
<b>HDL3 kolesterol</b>	<b>-0,355</b>	<b>0,027</b>
<b>LDL kolesterol</b>	<b>-0,337</b>	<b>0,035</b>
VLDL kolesterol	0,126	0,253
Trigliceridi	0,128	0,25
LDL/HDL kolesterol	0,035	0,426
<i>ne-HDL kolesterol</i>	-0,279	0,071
<b>aGLP-1<sup>  </sup> 0'</b>		
Ukupni kolesterol	0,077	0,343
HDL kolesterol	-0,24	0,101
HDL2 kolesterol	0,092	0,315
<b>HDL3 kolesterol</b>	<b>-0,367</b>	<b>0,023</b>
LDL kolesterol	0,139	0,233
VLDL kolesterol	0,108	0,286
Trigliceridi	0,105	0,29
<i>LDL/HDL kolesterol</i>	0,256	0,086
ne-HDL kolesterol	0,157	0,203
<b>aGLP-1 30'</b>		

<b>Ukupni kolesterol</b>	<b>-0,439</b>	<b>0,008</b>
<b>HDL kolesterol</b>	<b>-0,4</b>	<b>0,014</b>
HDL2 kolesterol	-0,036	0,425
<b>HDL3 kolesterol</b>	<b>-0,392</b>	<b>0,016</b>
<b>LDL kolesterol</b>	<b>-0,352</b>	<b>0,028</b>
VLDL kolesterol	0,175	0,177
Trigliceridi	0,167	0,189
LDL/HDL kolesterol	-0,014	0,47
<b>ne-HDL kolesterol</b>	<b>-0,311</b>	<b>0,047</b>

\*uGLP-1- ukupni peptid 1 sličan glukagonu, † HDL- kolesterol visoke gustoće, ‡ LDL- kolesterol male gustoće, § VLDL- kolesterol vrlo male gustoće, || aGLP-1- aktivni peptid 1 sličan glukagonu.

Tablica 9. prikazuje odnos zavisne varijable u GLP-1 30' i ukupnog kolesterola u multiploj linearnoj regresiji standardiziranoj za dob, trajanje ŠBT1 i uzimanje statina u terapiji (multivarijatna analiza). Koncentracija uGLP-1 30' neovisno o navedenim varijablama negativno korelira s ukupnim kolesterolom.

Tablica 9. Multipla linearna regresija standardizirana za dob, trajanje ŠBT1<sup>†</sup> i uzimanje statina odnosa zavisne varijable uGLP-1 30'<sup>\*</sup> i ukupnog kolesterola.

<b>Varijabla</b>	<b>Koeficijent beta</b>	<b>P</b>
<b>Ukupni kolesterol</b>	<b>-0,401</b>	<b>0,026</b>
Dob	0,105	0,631
Trajanje ŠBT1	-0,229	0,241
Statin	0,69	0,003

\*zavisna varijabla: uGLP-1 30'- ukupni postprandijalni peptid 1 sličan glukagonu. †ŠBT1- šećerna bolest tipa 1.

#### 5.3.2.1. Razlike u lipidemiji s obzirom na medijan vrijednosti GLP-1

Mann-Whitneyevim testom izvršena je analiza razlika između skupina ispitanika podijeljenih s obzirom na medijan vrijednosti GLP-1, a koji su uzimani kao rezne granične (eng. „cut off“) vrijednosti. Medijan koncentracija hormona iznosio je: uGLP-1 0'= 0,4 pmol/l, uGLP-1 30'= 4,4 pmol/l, aGLP-1 0'= 0,2 pmol/l, aGLP-1 30'= 1,25 pmol/l. Ispitanici s vrijednosti jednako medijanu pripadao je skupini s manjom vrijednosti tog obilježja.

Skupina ispitanika s manjom koncentracijom uGLP-1 u 30' imala je statistički značajno veću koncentraciju HDL kolesterola u odnosu na skupinu s većom

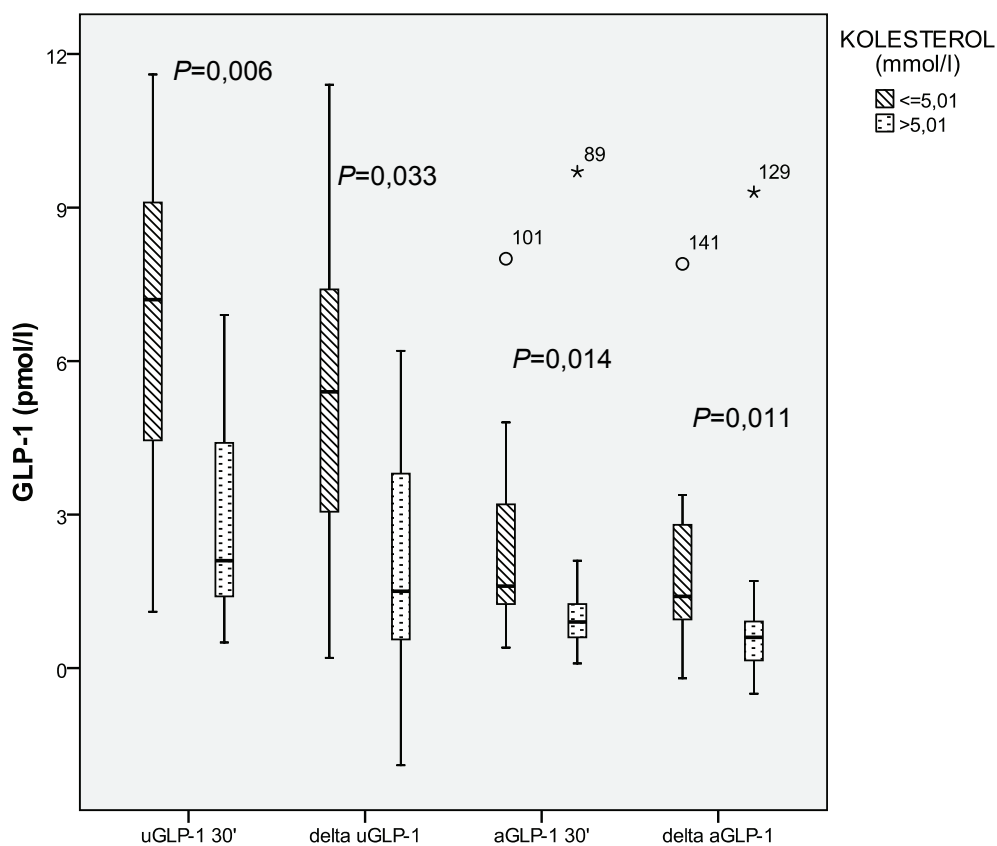


koncentracijom uGLP-1 u 30' (1,76 mmol/l, od 1,25 do 2,55 vs 1,44 mmol/l, od 0,97 do 1,85;  $z=-2,779$ ,  $P=0,005$ ).

Također je nađena značajna statistička razlika u koncentraciji ukupnog kolesterola, HDL- i LDL kolesterola između 2 skupine prema medijanu aGLP-1 30'. Skupina ispitanika s nižom koncentracijom aGLP-1 30' je imala veću koncentraciju ukupnog kolesterola (5,55 mmol/l, od 4,39 do 6,59 vs 4,55 mmol/l, od 3,67 do 7,61;  $z=-2,531$ ,  $P=0,011$ ), HDL- (1,8 mmol/l, od 0,97 do 2,55 vs 1,49 mmol/l, od 1,15 do 1,98;  $z=-2,199$ ,  $P=0,028$ ) i LDL kolesterola (3,36 mmol/l, od 2,21 do 4,4 vs 2,58 mmol/l, od 1,88 do 4,98;  $z=-2,012$ ,  $P=0,044$ ) u odnosu na skupinu s većom koncentracijom aGLP-1 30'.

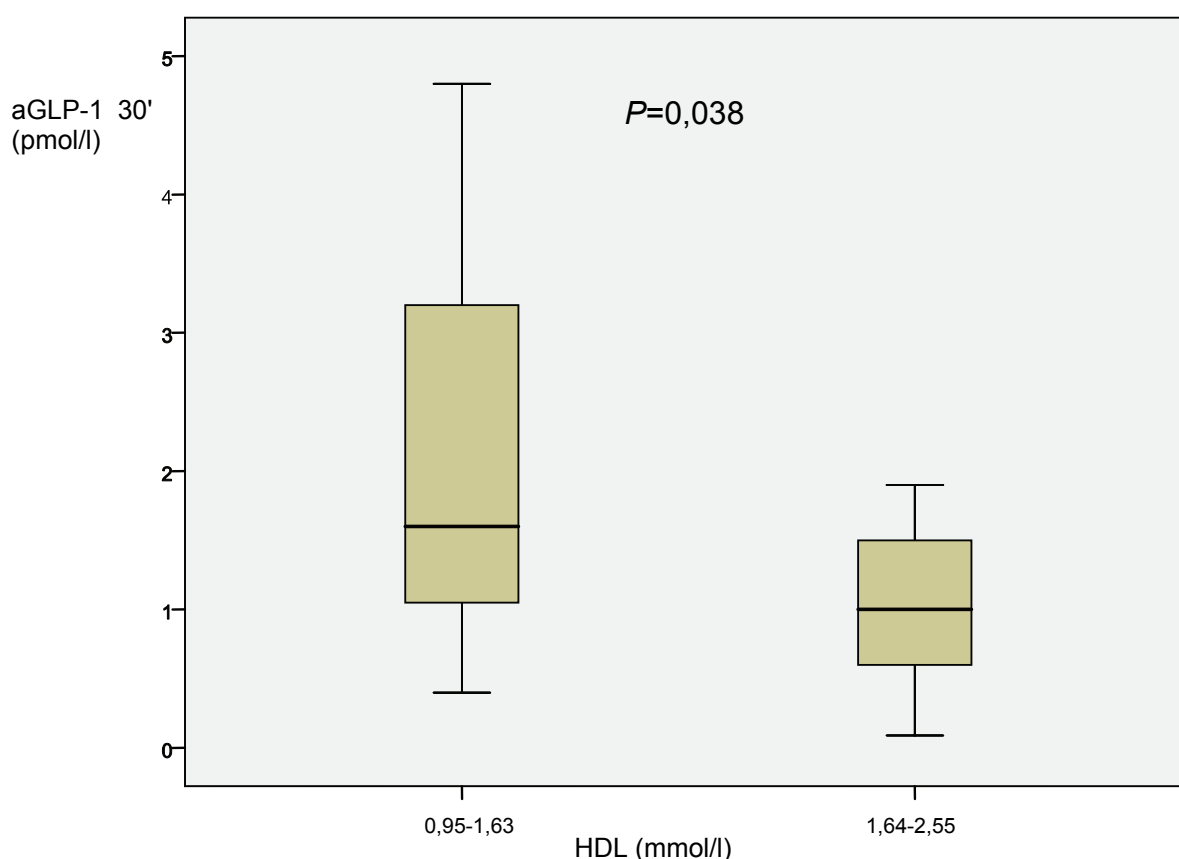
#### 5.3.2.2. Razlike u GLP-1 s obzirom na medijane koncentracija obilježja lipidemije

Mann-Whitneyev test upotrijebljen je za usporedbu GLP-1 između ispitanika podijeljenih u skupine s obzirom na rezne vrijednosti koje su nađene kao medijani vrijednosti obilježja lipidograma. Kada podijelimo ispitanike sa ŠBT1 prema medijanu koncentracije ukupnog kolesterola (5,01 mmol/l) nađena je statistički značajna razlika u koncentracijama uGLP-1 30' ( $z=-2,759$ ,  $P=0,006$ ),  $\Delta$  uGLP-1 ( $z=-2,137$ ,  $P=0,033$ ), aGLP-1 30' ( $z=-2,451$ ,  $P=0,014$ ) te  $\Delta$  aGLP-1 ( $z=-2,533$ ,  $P=0,011$ ). Osobe koje su imale manju koncentraciju ukupnog kolesterola su imale veću koncentraciju uGLP-1 30' (7,2 pmol/l, od 1,1 do 29 vs 2,1 pmol/l, od 0,5 do 23), veći  $\Delta$  uGLP-1 (5,4 pmol/l, od 0,2-24,3 vs 1,5 pmol/l, od -1,9 do 22,8) te veću koncentraciju aGLP-1 30' (1,6 pmol/l, od 0,4 do 8 vs 0,9 pmol/l, od 0,09 do 9,7) i  $\Delta$  aGLP-1 (1,4 pmol/l, od -0,2 do 7,9 vs 0,6 pmol/l, od -0,5 do 9,3) u odnosu na osobe s većom koncentracijom kolesterola (Slika 12.).



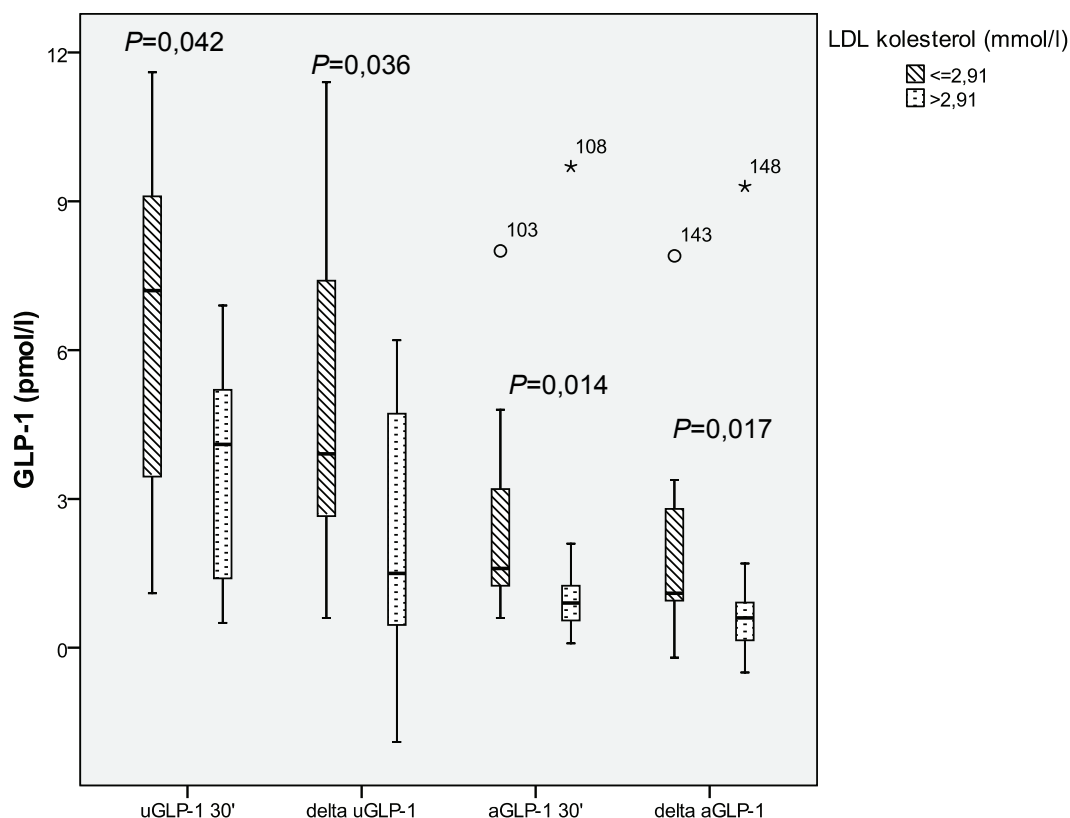
Slika 12. Postprandijalne koncentracije i delta vrijednosti ukupnog i aktivnog peptida 1 sličnog glukagonu (uGLP-1 30',  $\Delta$  uGLP-1, aGLP-1 30' i  $\Delta$  aGLP-1) s obzirom na medijan ukupnog kolesterola (5,01 mmol/l). Skupina s manjim medijanom ukupnog kolesterola, n=15 iscrtkani graf, s većim medijanom ukupnog kolesterola, n=15 točkasti graf; Mann-Whitneyev test.

Kada podijelimo ispitanike prema medijanu koncentracije HDL kolesterola (1,63 mmol/l) dobijemo statistički značajnu razliku u koncentraciji aGLP-1 30' ( $z=-2,077$ ,  $P=0,038$ ). Ispitanici s nižom koncentracijom HDL kolesterola su imali veću koncentraciju aGLP-1 u 30' u odnosu na ispitanike s većom koncentracijom HDL kolesterola (1,6 mmol/l, od 0,4 do 8 vs 1 mmol/l, od 0,09 do 9,7) (Slika 13.).



Slika 13. Postprandijalna koncentracija aktivnog peptida 1 sličnog glukagonu (aGLP-1 30') s obzirom na medijan koncentracije kolesterola visoke gustoće (HDL kolesterola) (1,63 mmol/l). Skupina s manjim medijanom HDL kolesterola, n=15, s većim medijanom HDL kolesterola, n=15; Mann-Whitneyev test.

Kada podijelimo ispitanike prema medijanu koncentracije LDL kolesterola (2,91 mmol/l) dobijemo statistički značajnu razliku u koncentraciji uGLP-1 u 30' ( $z=-2,033$ ,  $P=0,042$ ),  $\Delta$  uGLP-1 ( $z=-2,095$ ,  $P=0,036$ ), aGLP-1 30' ( $z=-2,451$ ,  $P=0,014$ ) te  $\Delta$  aGLP-1 30' ( $z=-2,388$ ,  $P=0,017$ ). Ispitanici s nižom koncentracijom LDL kolesterola su imali veću koncentraciju uGLP-1 u 30' (7,2 pmol/l, od 1,1 do 29 vs 4,1 pmol/l, od 0,5 do 23),  $\Delta$  uGLP-1 (3,91 pmol/l, od 0,6 do 24,3 vs 1,5 pmol/l, od -1,9 do 22,8), aGLP-1 30' (1,6 pmol/l, od 0,6 do 8 vs 0,9 pmol/l, od 0,09 do 9,7) te  $\Delta$  aGLP-1 (1,1 pmol/l, od -0,2 do 7,9 vs 0,6 pmol/l, od -0,5 do 9,3) u odnosu na ispitanike s većom koncentracijom LDL kolesterola (Slika 14.).



Slika 14. Postprandijalne koncentracije i delta vrijednosti ukupnog i aktivnog peptida 1 sličnog glukagonu (uGLP-1 30', Δ uGLP-1, aGLP-1 30' i Δ aGLP-1) s obzirom na medijan kolesterola male gustoće (LDL kolesterola) (2,91 mmol/l). Skupina s manjim medijanom LDL kolesterola, n=15 iscrtkani graf, s većim medijanom ukupnog kolesterola, n=15 točkasti graf; Mann-Whitneyev test.

### 5.3.3. GLP-1 u plazmi i mikrovaskularne komplikacije

Tablice 10., 11. i 12. prikazuju koncentracije GLP-1 s obzirom na prisutnost mikrovaskularnih komplikacija u ispitanika sa ŠBT1 (N=30). Nađena je veća koncentracija aGLP-1 0' u osoba bez dijabetičke neuropatije, iako granično za statističku značajnost.

Tablica 10. Peptid 1 sličan glukagonu u ispitanika sa šećernom bolesti tipa 1 s obzirom na postojanje dijabetičke nefropatije (N=30; Mann-Whitneyev one tailed test).

Varijabla	Dijabetička	Bez	z	P
-----------	-------------	-----	---	---

	<b>nefropatija (n=5)</b>	<b>dijabetičke neuropatije (n=25)</b>		
<b>GLP-1*</b>				
<b>(pmol/l)</b>				
<b>Ukupni</b>				
0'	0,5 (0,04-1,2)	0,3 (0-6,4)	-0,056	0,483
30'	1,5 (1,1-23)	4,5 (0,5-29)	-0,668	0,263
Δ	1,46 (0,6-22,8)	3,6 (-1,9-24,3)	-0,25	0,41
<b>Aktivni</b>				
0'	0,2 (0,02-0,4)	0,2 (0-1,9)	-0,28	0,402
30'	2,1 (0,6-9,7)	1,2 (0,09-8)	-1,226	0,117
Δ	1,7 (0,47-9,3)	0,9 (-0,5-7,9)	-1,365	0,091

\* GLP-1- peptid 1 sličan glukagonu.

**Tablica 11. Peptid 1 sličan glukagonu u ispitanika sa šećernom bolesti tipa 1 s obzirom na postojanje dijabetičke neuropatije (N=30; Mann-Whitneyev one tailed test).**

<b>Varijabla</b>	<b>Dijabetička neuropatija (n=16)</b>	<b>Bez dijabetičke neuropatije (n=14)</b>	<b>z</b>	<b>P</b>
<b>GLP-1*</b>				
<b>(pmol/l)</b>				
<b>Ukupni</b>				
0'	0,2 (0-6,4)	0,7 (0-5,5)	-0,646	0,265
30'	5,85 (0,5-29)	3,45 (0,6-9,4)	-0,998	0,164
Δ	4,72 (-1,9-24,3)	2,35 (0,2-7,8)	-1,476	0,072
<b>Aktivni</b>				
0'	0,17 (0,02-1,9)	0,35 (0-1,7)	-0,775	0,225
30'	1,3 (0,4-4,8)	1,2 (0,09-9,7)	0	0,504
Δ	0,96 (-0,5-3,38)	0,9 (-0,31-9,3)	-0,229	0,415

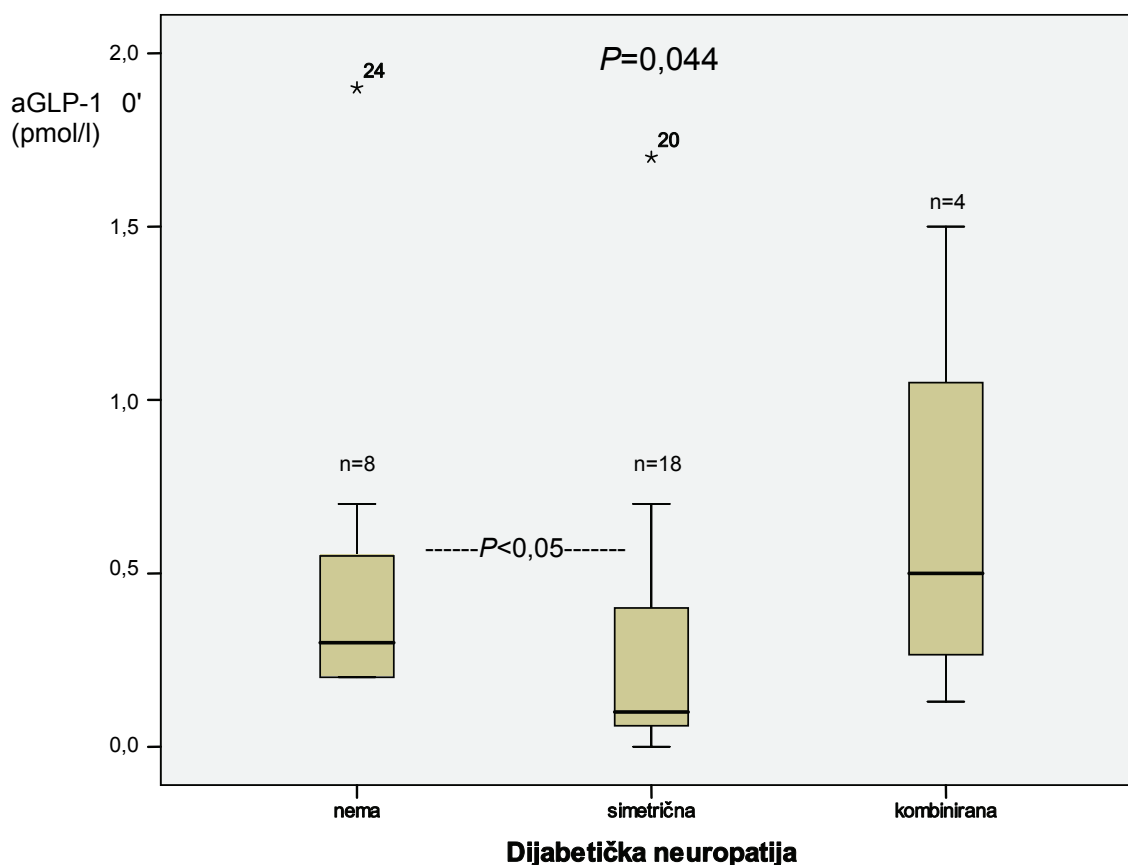
\* GLP-1- peptid 1 sličan glukagonu.

**Tablica 12. Peptid 1 sličan glukagonu u ispitanika sa šećernom bolesti tipa 1 s obzirom na postojanje dijabetičke neuropatije (N=30; Mann-Whitneyev one tailed test).**

Varijabla	Dijabetička neuropatija (n=22)	Bez dijabetičke neuropatije (n=8)	z	P
GLP-1*				
(pmol/l)				
Ukupni				
0'	0,25 (0-5,5)	0,6 (0,1-6,4)	-1,059	0,151
30'	4,8 (0,6-29)	4,4 (0,5-23)	-0,281	0,396
Δ	3,86 (0,3-24,3)	2,15 (-1,9-22,8)	-1,22	0,116
Aktivni				
0'	0,1 (0-1,7)	0,3 (0,2-1,9)	-1,582	0,059
30'	1,35 (0,09-9,7)	1,2 (0,4-2,1)	-0,399	0,352
Δ	0,96 (-0,31-9,3)	0,9 (-0,5-1,7)	-1,08	0,146

\* GLP-1- peptid 1 sličan glukagonu.

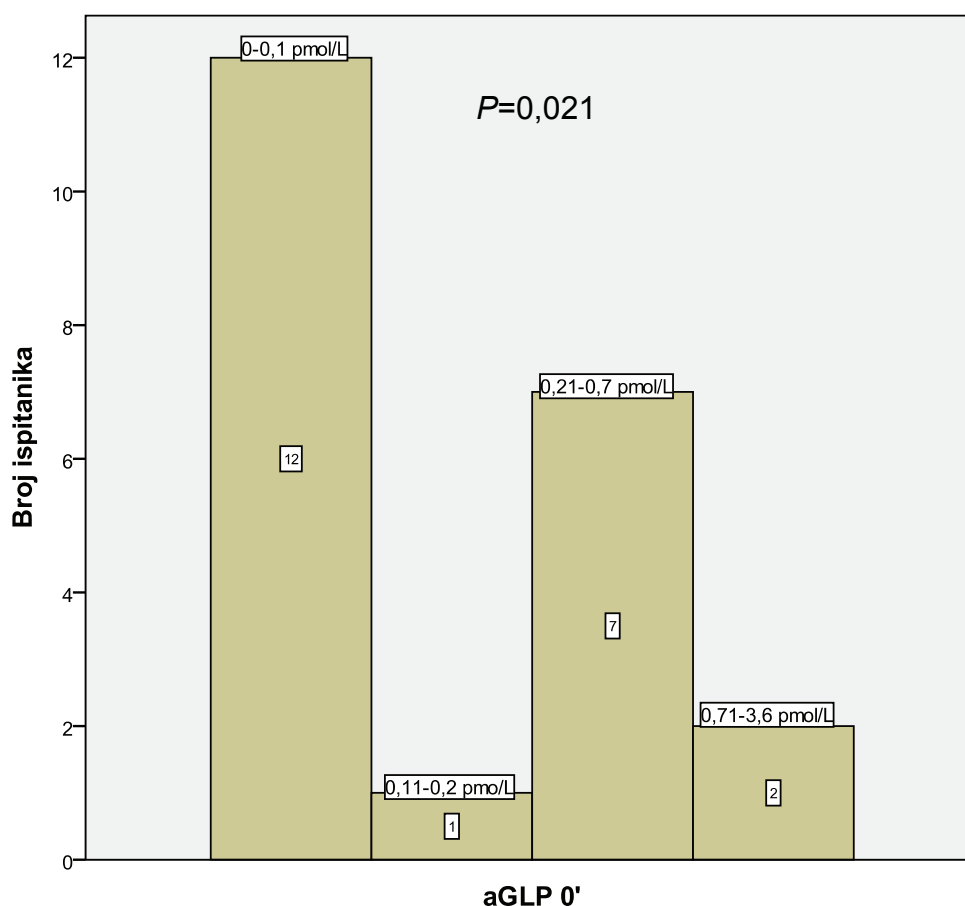
Statistički značajna razlika u koncentraciji aGLP-1 u 0' nađena je između ispitanika koje nisu imale dijabetičku neuropatiju, koje su imale simetričnu te koje su imale kombiniranu dijabetičku neuropatiju,  $\chi^2=6,245$ ,  $P=0,044$  (Slika 15.). Osobe koje su imale simetričnu neuropatiju su imale značajno niži medijan koncentracije aGLP-1 u 0' u usporedbi s ispitanicima koji nisu imale neuropatiju (0,1 pmol/l, od 0-1,7 vs 0,3 pmol/l, od 0,2 do 1,9,  $z=-2,018$ ,  $P=0,044$ ).



Slika 15. Bazalna koncentracija aktivnog peptida 1 sličnog glukagonu (aGLP-1 0') u 3 skupine dijabetičke neuropatije (N=30; Kruskal-Wallisov test, *post hoc* Mann-Whitneyev test).

#### 5.3.3.1. Učestalost dijabetičke neuropatije s obzirom na podjelu ispitanika prema kvartilama vrijednosti GLP-1

Kada podijelimo ispitanike sa ŠBT1 prema kvartilama vrijednosti hormona uočena je značajna statistička razlika u učestalosti dijabetičke neuropatije između osoba unutar različitih kvartila aGLP-1 0' ( $\chi^2=9,739$ ,  $P=0,021$ ). Kvartila osoba s najmanjom vrijednosti aGLP-1 u 0' imala je najveću učestalost dijabetičke neuropatije (Slika 16.).



Slika 16. Učestalost dijabetičke neuropatije s obzirom na podjelu ispitanika (N=30) prema kvartilama aktivnog peptida 1 sličnog glukagonu natašte (aGLP-1 0'),  $\chi^2$  test.

## 5.4. Povezanost FGF-21 s regulacijom glikemije, lipidemijom i mikrovaskularnim komplikacijama u ispitanika sa ŠBT1

### 5.4.1. FGF-21 u serumu i regulacija glikemije

Tablica 13. prikazuje povezanost koncentracija FGF-21 s regulacijom glikemije u ispitanika sa ŠBT1. Nađena je pozitivna povezanost između bazalne koncentracije FGF-21 u 0' s HbA1c (iskazanim u %),  $\rho=0,271$ ,  $P=0,073$  te s HbA1c (iskazanim u mmol/mol),  $\rho=0,296$ ,  $P=0,056$ , međutim nedovoljna za zadane kriterije statističke značajnosti. Unatoč tome, linearna regresija je pokazala statistički značajnu neovisnu povezanost između FGF-21 0' s HbA1c (mmol/mol),  $P=0,039$ ,  $R^2=0,143$  (FGF-21 0'=2,165-1,327\*HbA1c) (Slika 17.).

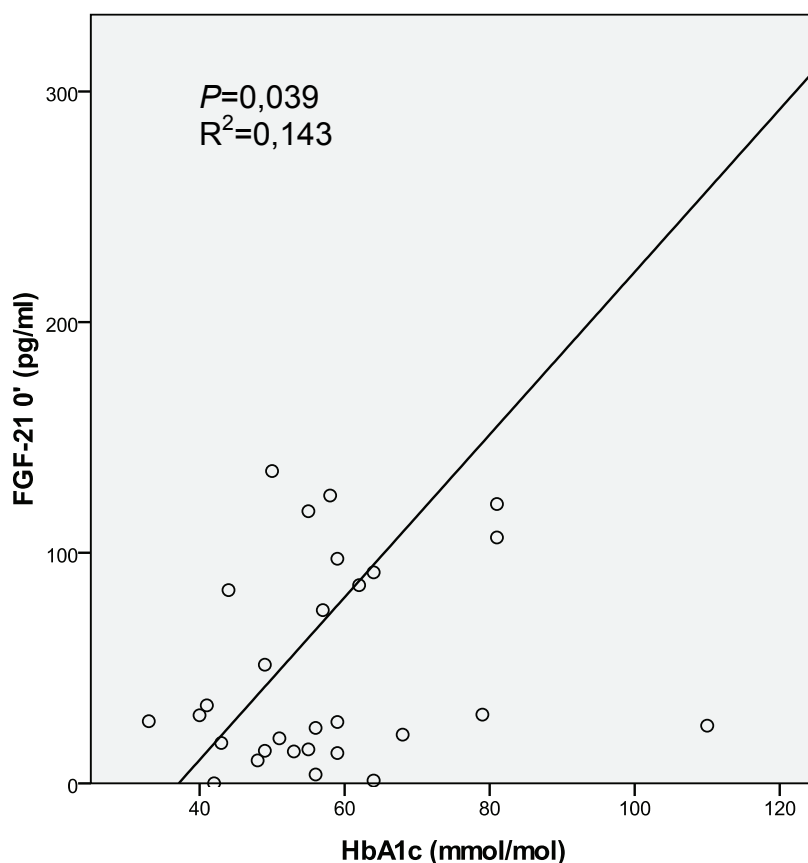


Nije nađena statistički značajna korelacija FGF-21 u 30' s regulacijom glikemije (HbA1c postotno i u mmol/mol, GUP u 0' i u 30').

**Tablica 13. Povezanost čimbenika rasta fibroblasta-21 (FGF-21) s regulacijom glikemije u ispitanika sa šećernom bolesti tipa 1 (ŠBT1); N=30; Spearmanov one-tailed test.**

Varijable u korelaciji	Koeficijent korelacije ( $\rho$ )	<i>P</i>
<i>FGF-21 0'</i>		
GUP <sup>†</sup> 0'	0,017	0,464
GUP 30'	-0,103	0,294
$\Delta$ GUP <sup>‡</sup>	-0,037	0,422
HbA1c <sup>§</sup> (%)	0,271	0,073
HbA1c (mmol/mol)	0,296	0,056
<i>FGF-21 30'</i>		
GUP 0'	-0,017	0,464
GUP 30'	0,027	0,444
$\Delta$ GUP	0,061	0,375
HbA1c (%)	0,164	0,193
HbA1c (mmol/mol)	0,179	0,173

<sup>†</sup>FGF-21- čimbenik rasta fibroblasta-21, <sup>†</sup>GUP- glukoza u plazmi, <sup>‡</sup> $\Delta$ GUP- razlika između GUP 30' i GUP 0', <sup>§</sup>HbA1c- glikirani hemoglobin.



Slika 17. Povezanost bazalne koncentracije čimbenika rasta fibroblasta-21 (FGF-21 0') s glikiranim hemoglobinom (HbA1c) iskazanim u mmol/mol, linearna regresija.

Tablica 14. prikazuje odnos zavisne varijable FGF-21 0' i HbA1c (mmol/mol) u multiploj linearnoj regresiji standardiziranoj za dob (multivarijatna analiza). Koncentracija FGF-21 0' neovisno o dobi pozitivno korelira s HbA1c.

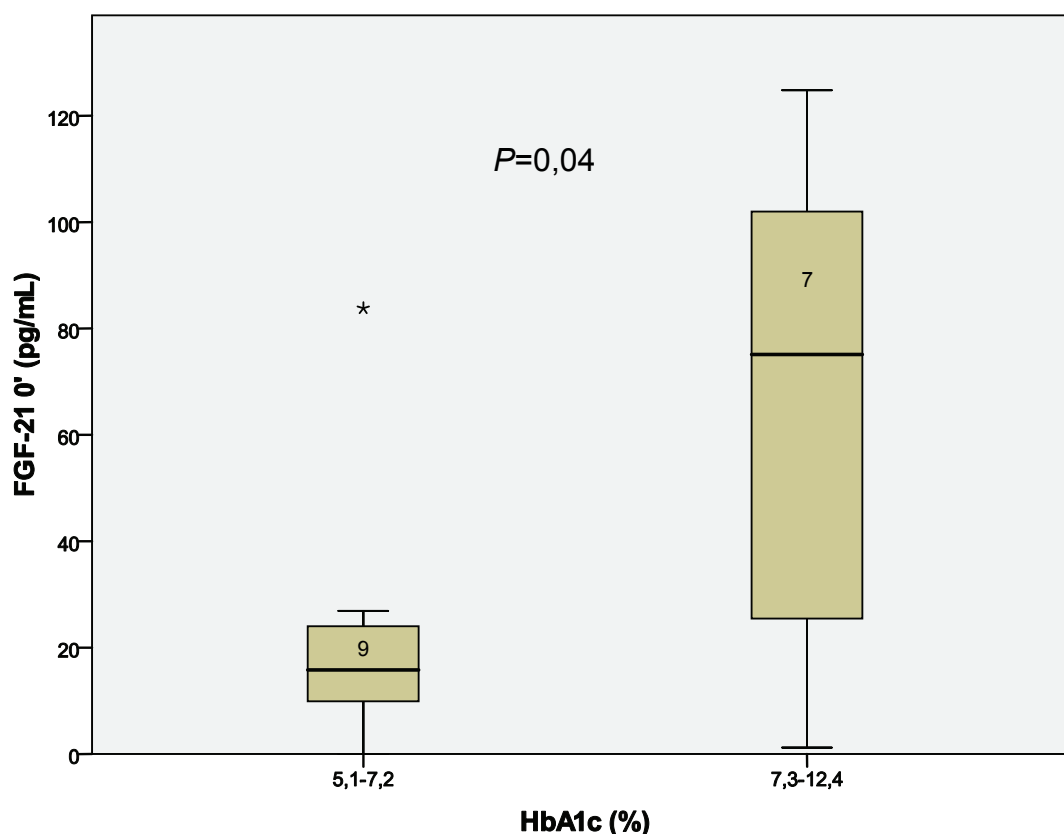
Tablica 14. Multipla linearna regresija standardizirana za dob, odnosa zavisne varijable uFGF-21 0' i glikiranog hemoglobina iskazanog u mmol/mol.

Varijabla	Koeficijent beta	<i>P</i>
HbA1c <sup>†</sup>	0,374	0,049
Dob	-0,025	0,891

\* zavisna varijabla: FGF-21 0'- čimbenik rasta fibroblasta-21. <sup>†</sup>HbA1c- glikirani hemoglobin.

#### 5.4.1.1. FGF-21 i regulacija glikemije s obzirom na spol

U skupini muškaraca nađena je statistički značajna razlika u koncentraciji FGF-21 u 0' između 2 skupine ispitanika podijeljenih s obzirom na medijan postotka HbA1c (7,2%) ( $z=-2,049$ ,  $P=0,04$ ). Muškarci koji imaju bolju regulaciju glikemije imaju manju vrijednost FGF-21 0' u odnosu na muškarce s lošijom regulacijom glikemije (15,7, od 0 do 83,8 pg/ml vs 75,1, od 1,2 do 124,8 pg/ml) (Slika 18.).



Slika 18. Razlika u bazalnoj koncentraciji čimbenika rasta fibroblasta-21 (FGF-21 u 0') između muškaraca (n=16) s boljom i lošijom regulacijom glikemije (s obzirom na medijan glikiranog hemoglobina (HbA1c)).

#### 5.4.2. FGF-21 u serumu i vrijednosti lipida

Tablica 15. prikazuje povezanost koncentracija FGF-21 s lipidemijom u ispitanika sa ŠBT1. Gledajući povezanost FGF-21 s lipidnim parametrima, uočena je pozitivna povezanost između FGF-21 u 0' i HDL kolesterola ( $\rho=0,284$ ,  $P=0,064$ ), iako nedovoljno statistički značajna. Također je nađena

značajna statistička pozitivna povezanost između FGF-21 u 0' i HDL3 kolesterola ( $p=0,35$ ,  $P=0,029$ ). Nađena je statistički značajna pozitivna povezanost između FGF-21 u 30' i HDL ( $p=0,321$ ,  $P=0,042$ ) i HDL3 kolesterola ( $p=0,435$ ,  $P=0,008$ ).

**Tablica 15. Povezanost čimbenika rasta fibroblasta-21 s lipidemijom u ispitanika sa šećernom bolesti tipa 1 (N=30; Spearmanov one tailed test).**

Varijable u korelaciji	Koeficijent korelacije ( $\rho$ )	<i>P</i>
<b>FGF-21* 0'</b>		
Ukupni kolesterol	0,005	0,49
<i>HDL<sup>†</sup> kolesterol</i>	<i>0,284</i>	<i>0,064</i>
HDL2 kolesterol	0,108	0,286
<b>HDL3 kolesterol</b>	<b>0,35</b>	<b>0,029</b>
LDL <sup>‡</sup> kolesterol	-0,079	0,339
VLDL <sup>§</sup> kolesterol	0,022	0,453
Trigliceridi	0,019	0,46
<b>LDL/HDL kolesterol</b>	<b>-0,307</b>	<b>0,049</b>
ne-HDL kolesterol	-0,106	0,289
<b>FGF-21 30'</b>		
Ukupni kolesterol	0,043	0,411
<b>HDL kolesterol</b>	<b>0,321</b>	<b>0,042</b>
HDL2 kolesterol	0,112	0,279
<b>HDL3 kolesterol</b>	<b>0,435</b>	<b>0,008</b>
LDL kolesterol	-0,042	0,413
VLDL kolesterol	-0,071	0,354
Trigliceridi	-0,074	0,349
<i>LDL/HDL kolesterol</i>	<i>-0,298</i>	<i>0,055</i>
ne-HDL kolesterol	-0,102	0,295

\* FGF-21- čimbenik rasta fibroblasta-21, <sup>†</sup>HDL- kolesterol visoke gustoće, <sup>‡</sup>LDL- kolesterol male gustoće, <sup>§</sup>VLDL- kolesterol vrlo male gustoće.

#### 5.4.2.1. Razlike u lipidemiji s obzirom na medijan vrijednosti FGF-21

Mann-Whitneyevim testom izvršena je analiza razlika između skupina ispitanika podijeljenih s obzirom na medijan vrijednosti FGF-21, a koji su uzimani kao rezne granične vrijednosti. Medijan koncentracija hormona iznosio je: FGF-21 0'= 28,2 pmol/l i FGF-21 30'= 28,25 pmol/l. Ispitanici s vrijednosti jednakoj medijanu pripadao je skupini s manjom vrijednosti tog obilježja.

Skupina ispitanika s nižom koncentracijom FGF-21 u 0' je imala nižu koncentraciju HDL3 kolesterola (0,96 mmol/l, od 0,58 do 1,44 vs 1,18 mmol/l, od 0,87 do 1,75;  $z=-2,137$ ,  $P=0,033$ ) u odnosu na skupinu s većom koncentracijom FGF-21 u 0'.

#### 5.4.3. FGF-21 u serumu i mikrovaskularne komplikacije

Tablice 16., 17. i 18. prikazuju koncentracije FGF-21 s obzirom na prisutnost mikrovaskularnih komplikacija u ispitanika sa ŠBT1 (N=30). Nije nađena statistički značajna razlika u koncentraciji FGF-21 s obzirom na prisutnost mikrovaskularnih komplikacija.

**Tablica 16. Čimbenik rasta fibroblasta-21 u ispitanika sa šećernom bolesti tipa 1 s obzirom na postojanje dijabetičke nefropatije (N=30; Mann-Whitneyev one tailed test).**

<b>Varijabla</b>	<b>Dijabetička nefropatija (n=5)</b>	<b>Bez dijabetičke nefropatije (n=25)</b>	<b>z</b>	<b>P</b>
FGF-21*				
(pg/ml)				
0'	24 (3,8-842,4)	29,8 (0-135,4)	-0,751	0,241
30'	24,7 (0-946)	31,8 (0-167,1)	-0,167	0,439
$\Delta$	2,6 (-3,8-103,6)	-2 (-53,9-61,7)	-1,642	0,054

\* FGF-21- čimbenik rasta fibroblasta-21.

**Tablica 17. Čimbenik rasta fibroblasta-21 u ispitanika sa šećernom bolesti tipa 1 s obzirom na postojanje dijabetičke retinopatije (N=30; Mann-Whitneyev one tailed test).**

<b>Varijabla</b>	<b>Dijabetička retinopatija (n=16)</b>	<b>Bez dijabetičke retinopatije (n=14)</b>	<b>z</b>	<b>P</b>
FGF-21*				
(pg/ml)				
0'	26,75 (0-124,8)	29,65 (13,8-842,4)	-1,039	0,157

30'	28,25 (0-167,1)	43,15 (4,4-946)	0	0,504
$\Delta$	0,35 (-15,3-60,5)	-7,4 (-53,9-103,6)	-1,538	0,064

\*FGF-21- čimbenik rasta fibroblasta-21.

**Tablica 18. Čimbenik rasta fibroblasta-21 u ispitanika sa šećernom bolesti tipa 1 s obzirom na postojanje dijabetičke neuropatije (N=30; Mann-Whitneyev one tailed test).**

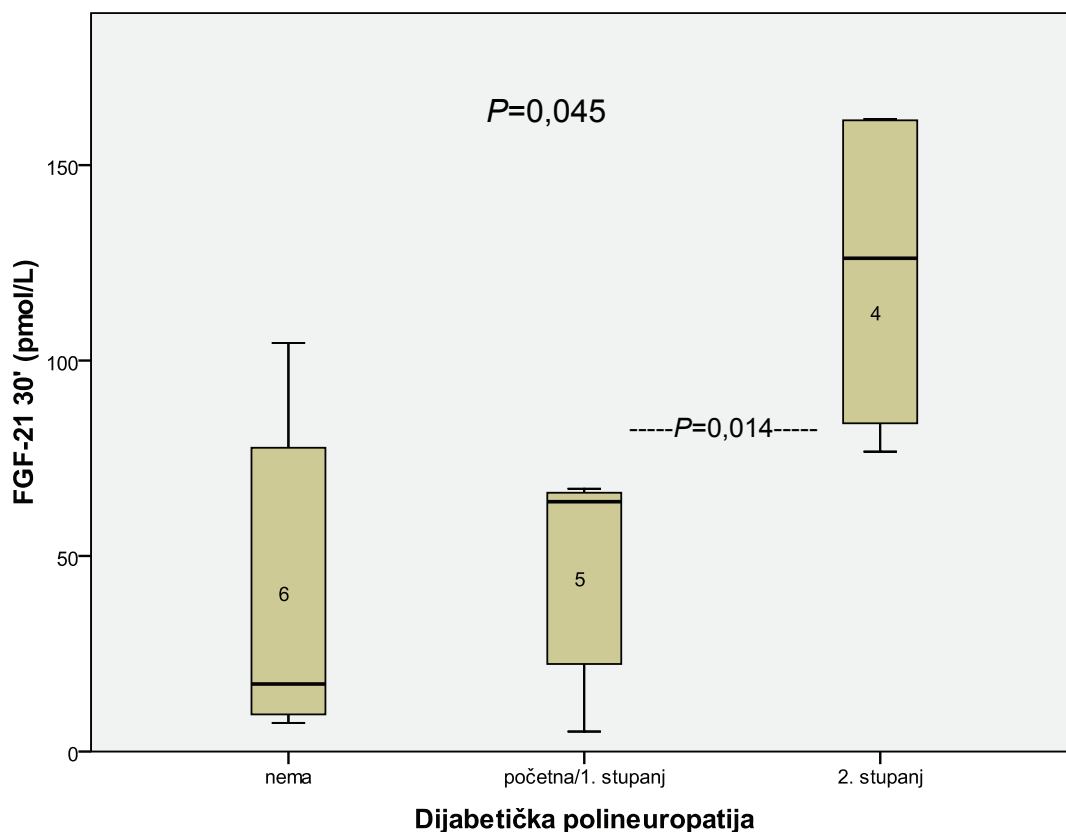
Varijabla	Dijabetička neuropatija (n=22)	Bez dijabetičke neuropatije (n=8)	z	P
FGF-21*				
(pg/ml)				
0'	28,2 (0-842,4)	26,65 (3,8-106,6)	-0,469	0,331
30'	40,4 (0-946)	17,25 (0-167,1)	-0,446	0,335
$\Delta$	-0,19 (-53,9-103,6)	-5,6 (-13,8-60,9)	-0,68	0,255

\*FGF-21- čimbenik rasta fibroblasta-21.

#### 5.4.3.1. FGF-21 i dijabetička polineuropatija s obzirom na inzulinsku osjetljivost prema eGDR

Kada podijelimo osobe sa ŠBT1 u dvije skupine, prema medijanu vrijednosti eGDR (8,8 mg/kg/min), unutar skupine s većom vrijednosti eGDR (veća IO, n=15) uočena je statistički značajna razlika u vrijednosti FGF-21 30' između osoba s različitim stupnjem dijabetičke polineuropatije ( $\chi^2=6,188$ ,  $P=0,045$ ; Kruskal-Wallisov test). Skupina osoba 1 (bez polineuropatije) je imala koncentraciju FGF-21 u 30' 17,25 pg/ml (0-167,1), skupina 2 (početna ili prvi stupanj polineuropatije) je imala koncentraciju FGF-21 u 30' 35,7 pg/ml (0-102,7), a skupina 3 (drugi stupanj polineuropatije) koncentraciju FGF-21 u 30' 54,25 pg/ml (0,3-946). Skupina ispitanika s drugim stupnjem dijabetičke polineuropatije je imala veću koncentraciju FGF-21 u 30' od skupine ispitanika s početnim ili prvim stupnjem polineuropatije ( $z=-2,449$ ,  $P=0,014$ ; *post hoc* Mann-Whitneyev test) u skupini ispitanika s većom IO (Slika 19.). Nije nađena statistički značajna razlika u koncentracijama drugih ispitivanih hormona između osoba različitog stupnja dijabetičke polineuropatije u ovoj skupini.

U skupini ispitanika s manjom IO prema medijanu eGDR nije nađeno statistički značajne razlike u koncentracijama ispitivanih hormona između osoba različitog stupnja dijabetičke polineuropatije.



Slika 19. Postprandijalna koncentracija čimbenika rasta fibroblasta-21 (FGF-21 30') s obzirom na stupanj dijabetičke polineuropatije u osoba (n=15) s većom inzulinskom osjetljivosti prema prosječnoj stopi raspoložive glukoze (eGDR >8,8 mg/kg/min); Kruskal-Wallisov test, *post hoc* Mann-Whitneyev test.

## 5.5. Međudnos koncentracija GLP-1 i FGF-21 u plazmi u ispitanika sa ŠBT1 i u zdravih kontrolnih ispitanika

Tablica 19. prikazuje povezanost između koncentracija GLP-1 (uGLP-1 i aGLP-1) i FGF-21 u plazmi u ispitanika sa ŠBT1 (N=30). Nađena je statistički značajna pozitivna povezanost koncentracije uGLP-1 u 0' s uGLP-1 u 30' ( $p=0,466$ ,  $P=0,01$ ) te između koncentracije FGF-21 u 0' i FGF-21 u 30' ( $p=0,912$ ,  $P<0,001$ ). Između plazmatskih koncentracija GLP-1 i FGF-21 nije nađena statistički značajna povezanost.

**Tablica 19. Povezanost peptida 1 sličnog glukagonu i čimbenika rasta fibroblasta-21 u plazmi u ispitanika sa šećernom bolesti tipa 1 (N=30, Spearmanov test).**

Varijable u korelaciji	Koeficijent korelacije ( $\rho$ )	<i>P</i>
uGLP-1* 0'		
uGLP-1 30'	<b>0,466</b>	<b>0,01</b>
FGF-21† 0'	0,083	0,663
FGF-21 30'	0,125	0,51
uGLP-1 30'		
FGF-21 0'	-0,169	0,372
FGF-21 30'	-0,213	0,258
aGLP-1‡ 0'		
aGLP-1 30'	0,195	0,301
FGF-21 0'	0,073	0,7
FGF-21 30'	0,065	0,732
aGLP-1 30'		
FGF-21 0'	0,138	0,468
FGF-21 30'	0,134	0,48
FGF-21 0'		
FGF-21 30'	<b>0,912</b>	<b>&lt;0,001</b>

\*uGLP-1- ukupni peptid 1 sličan glukagonu, † FGF-21- čimbenik rasta fibroblasta-21, ‡ aGLP-1- aktivni peptid 1 sličan glukagonu.

Tablica 20. prikazuje povezanost koncentracija GLP-1 i FGF-21 u plazmi zdravih kontrola (N=9). Nađena je statistički značajna pozitivna povezanost između koncentracije uGLP-1 0' s uGLP-1 30' ( $\rho=0,929$ ,  $P<0,001$ ), zatim između koncentracije aGLP-1 0' s aGLP-1 30' ( $\rho=0,745$ ,  $P=0,021$ ) te između koncentracije FGF-21 0' s FGF-21 30' ( $\rho=0,967$ ,  $P<0,001$ ). Nije nađena statistički značajna povezanost plazmatskih koncentracija GLP-1 s FGF-21 u zdravih kontrolnih ispitanika (zbog jedne zdrave kontrolne ispitanice, koja je bila stršeća vrijednost (eng. *outlier*) u koncentraciji FGF-21 u 0' i u 30', za računanje povezanosti uključeno je 9 zdravih kontrola).



**Tablica 20. Povezanost peptida 1 sličnog glukagonu i čimbenika rasta fibroblasta-21 u plazmi u zdravih kontrola (N=9, Spearmanov test).**

Varijable u korelaciji	Koeficijent korelacije ( $\rho$ )	<i>P</i>
uGLP-1* 0'		
uGLP-1 30'	<b>0,929</b>	<b>&lt;0,001</b>
FGF-21† 0'	0,268	0,486
FGF-21 30'	0,36	0,342
uGLP-1 30'		
FGF-21 0'	0,267	0,488
FGF-21 30'	0,4	0,286
aGLP-1‡ 0'		
aGLP-1 30'	<b>0,745</b>	<b>0,021</b>
FGF-21 0'	0,351	0,354
FGF-21 30'	0,536	0,137
aGLP-1 30'		
FGF-21 0'	-0,05	0,898
FGF-21 30'	0,167	0,668
FGF-21 0'		
FGF-21 30'	<b>0,967</b>	<b>&lt;0,001</b>

\*uGLP-1- ukupni peptid 1 sličan glukagonu, † FGF-21- čimbenik rasta fibroblasta-21, ‡ aGLP-1- aktivni peptid 1 sličan glukagonu.

Tablica 21. prikazuje povezanost GLP-1 s FGF-21 u osoba sa ŠBT1 s obzirom na spol. Muškarci su imali graničnu statistički značajnu pozitivnu povezanost koncentracija uGLP-1 u 0' s FGF-21 u 0' ( $\rho=0,478$ ,  $P=0,061$ ) i statistički značajnu pozitivnu povezanost uGLP-1 0' s FGF-21 30' ( $\rho=0,57$ ,  $P=0,021$ ). U zdravih kontrolnih ispitanika nije nađena statistička značajna povezanost GLP-1 s FGF-21 s obzirom na spol.

**Tablica 21. Povezanost peptida 1 sličnog glukagonu (GLP-1) i čimbenika rasta fibroblasta-21 (FGF-21) u plazmi u ispitanika sa šećernom bolesti tipa 1 (ŠBT1) s obzirom na spol (N=30, Spearmanov test).**

Varijable u korelaciji	Žene (n=14)	Muškarci (n=16)
------------------------	-------------	-----------------

	Koeficijent korelacije ( $\rho$ )	<i>P</i>	Koeficijent korelacije ( $\rho$ )	<i>P</i>
uGLP-1* 0'				
uGLP-1 30'	-0,02	0,994	0,388	0,138
FGF-21† 0'	0,031	0,916	0,478	0,061
FGF-21 30'	0,104	0,723	<b>0,57</b>	<b>0,021</b>
uGLP-1 30'				
FGF-21 0'	-0,106	0,719	0,124	0,649
FGF-21 30'	-0,214	0,463	0,025	0,927
aGLP-1‡ 0'				
aGLP-1 30'	-0,135	0,646	0,35	0,184
FGF-21 0'	0,082	0,781	0,297	0,264
FGF-21 30'	0,197	0,499	0,195	0,47
aGLP-1 30'				
FGF-21 0'	0,201	0,49	0,224	0,404
FGF-21 30'	0,144	0,624	0,263	0,326
FGF-21 0'				
FGF-21 30'	<b>0,877</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,921</b>	<b>&lt;0,001</b>

\*uGLP-1- ukupni peptid 1 sličan glukagonu, † FGF-21- čimbenik rasta fibroblasta-21, ‡ aGLP-1- aktivni peptid 1 sličan glukagonu.

## 5.6. Povezanost koncentracija GLP-1 s inzulinskom rezistencijom (eGDR), MS, koncentracijom glukagona u plazmi te inzulinom u ispitanika sa ŠBT1

Tablica 22. prikazuje povezanost koncentracija GLP-1 u plazmi s IR te njezinim biljezima, koncentracijom glukagona u plazmi natašte i postprandijalno te dnevnom dozom inzulina, dozom bazalnog inzulina te dozom bolus inzulina u ispitanika sa ŠBT1. Statistički značajne povezanosti nisu utvrđene.

**Tablica 22. Povezanost koncentracija peptida 1 sličnog glukagonu (GLP-1) u plazmi s inzulinskom rezistencijom (eGDR), koncentracijom glukagona u plazmi te dnevnom dozom inzulina u ispitanika sa šećernom bolešću tipa 1 (ŠBT1); Spearmanov test (N=30).**

Varijable u korelaciji	Koeficijent korelacije ( $\rho$ )	<i>P</i>
uGLP-1* 0'		
Trigliceridi/HDL <sup>†</sup>	0,184	0,331
eGDR <sup>‡</sup>	0,098	0,606
glukagon 0'	-0,067	0,725
glukagon 30'	-0,113	0,552
$\Delta$ glukagon <sup>§</sup>	-0,132	0,486
Ukupna dnevna doza inzulina (IU/kg/dan)	-0,028	0,883
Dnevna doza bazalnog inzulina	0,138	0,467
Dnevna doza bolus inzulina	-0,145	0,446
uGLP-1 30'		
Trigliceridi/HDL	0,227	0,228
eGDR	-0,25	0,182
glukagon 0'	-0,334	0,071
glukagon 30'	-0,17	0,37
$\Delta$ glukagon	-0,006	0,976
Ukupna dnevna doza inzulina (IU/kg/dan)	-0,165	0,383
Dnevna doza bazalnog inzulina	-0,047	0,807
Dnevna doza bolus inzulina	-0,188	0,319
aGLP-1 <sup>  </sup> 0'		
Trigliceridi/HDL	0,224	0,234
eGDR	0,2	0,29
glukagon 0'	-0,061	0,75
glukagon 30'	-0,159	0,401
$\Delta$ glukagon	-0,067	0,725
Ukupna dnevna doza inzulina (IU/kg/dan)	-0,026	0,89
Dnevna doza bazalnog inzulina	0,034	0,857
Dnevna doza bolus inzulina	-0,076	0,69
aGLP-1 30'		
Trigliceridi/HDL	0,293	0,116
eGDR	-0,07	0,714
glukagon 0'	0,012	0,948
glukagon 30'	0,226	0,229
$\Delta$ glukagon	-0,03	0,986

Ukupna dnevna doza inzulina (IU/kg/dan)	0,115	0,544
Dnevna doza bazalnog inzulina	-0,046	0,809
Dnevna doza bolus inzulina	0,139	0,462

\*uGLP-1- ukupni peptid 1 sličan glukagonu, <sup>†</sup> HDL- kolesterol visoke gustoće, <sup>‡</sup> eGDR- prosječna stopa raspoložive glukoze, <sup>§</sup>Δglukagon- razlika između glukagona 30' i glukagona 0', <sup>||</sup>aGLP-1- aktivni peptid 1 sličan glukagonu.

### 5.6.1. GLP-1 s obzirom na MS prema NCEP:ATPIII kriterijima

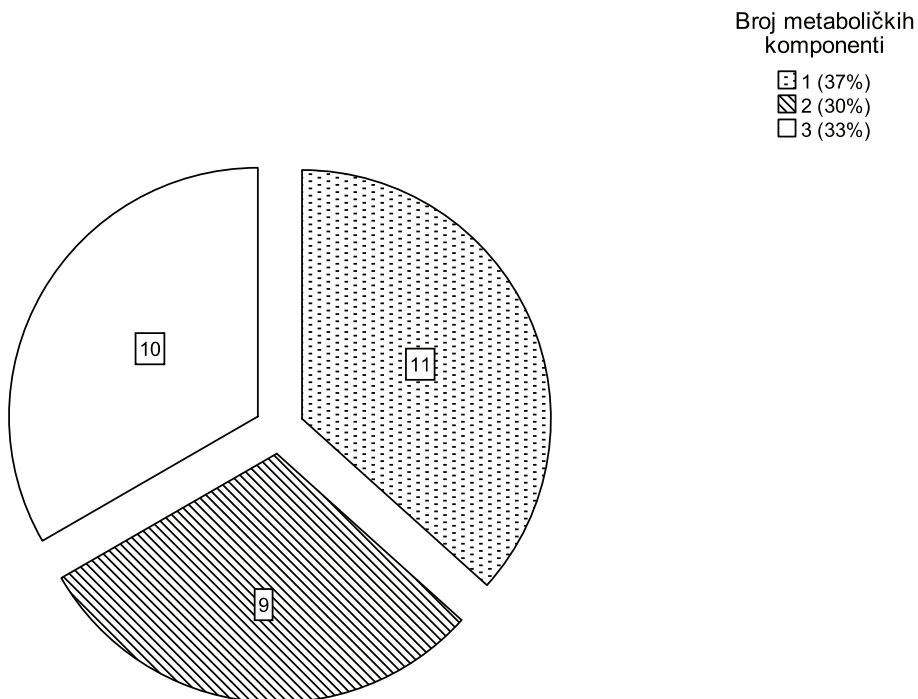
Mann-Whitneyevim testom ispitana je razlika u koncentracijama GLP-1 (uGLP-1 i aGLP-1) između osoba koje imaju i onih koji nemaju MS. Nađena je statistički značajna razlika u koncentraciji uGLP-1 u 30' te Δ uGLP-1. Osobe koje imaju MS su imale veću koncentraciju GLP-1 30' ( $z=-2,266$ ,  $P=0,023$ ) te veći Δ uGLP-1 30' ( $z=-2,288$ ,  $P=0,022$ ) od osoba koje nemaju MS (Tablica 23.).

**Tablica 23. Povezanost koncentracija peptida 1 sličnog glukagonu u plazmi s MS prema NCEP:ATPIII kriterijima (N=30, Mann-Whitney test).**

Varijabla	S metaboličkim sindromom (n=10)	Bez metaboličkog sindroma (n=20)	z	P
GLP-1*				
(pmol/l)				
Ukupni				
0'	0,45 (0-6,4)	0,4 (0-5,5)	-0,132	0,895
30'	6,55 (1,5-29)	3,45 (0,5-9,4)	<b>-2,266</b>	<b>0,023</b>
Δ 30'-0' <sup>†</sup>	5,95 (-1,9-24,3)	2,35 (0,2-7,8)	<b>-2,288</b>	<b>0,022</b>
Aktivni				
0'	0,17 (0,02-1,9)	0,3 (0-1,7)	-0,244	0,807
30'	1,15 (0,4-4,8)	1,4 (0,09-9,7)	-0,088	0,93
Δ 30'-0'	0,91 (-0,5-3,38)	0,95 (-0,31-9,3)	-0,044	0,965

\*GLP-1- peptid 1 sličan glukagonu; <sup>†</sup>Δ30'-0'- razlika između postprandijalne i bazalne koncentracije hormona.

Ispitanici sa ŠBT1 su podijeljeni prema broju kriterija MS (Slika 20.). Kriteriji su uključivali povišenu glikemiju (odnosno dijagnozu ŠBT1, što su imali svi ispitanici), OS, dislipidemiju te povišen krvni tlak.



Slika 20. Raspodjela ispitanika sa šećernom bolesti tipa 1 (ŠBT1) s obzirom broj kriterija metaboličkog sindroma (MS). Niti jedan bolesnik nije imao sva 4 kriterija istodobno (ŠBT1, dislipidemija, opseg struka, povišen krvni tlak). Brojevi u dijelovima pite prikazuju broj ispitanika; N=30.

Kruskal-Wallisovim testom ispitana je razlika u koncentracijama GLP-1 između skupina ispitanika s obzirom na broj kriterija MS (Tablica 24.). Nađena je statistički značajna razlika u uGLP-1 u 30' ( $\chi^2=6,145$ ,  $P=0,046$ ) te u  $\Delta$  uGLP-1 ( $\chi^2=6,269$ ,  $P=0,044$ ) s obzirom na broj MS kriterija. Osobe s 3 komponente MS su imale veću koncentraciju uGLP-1 30' ( $z=-2,465$ ,  $P=0,014$ ) te  $\Delta$  uGLP-1 ( $z=-2,394$ ,  $P=0,017$ ) od osoba s 1 komponentom MS

Nađena je i statistički značajna razlika u vrijednosti eGDR s obzirom na broj kriterija MS ( $\chi^2=8,512$ ,  $P=0,014$ ) (Tablica 24.). Osobe koje su imale 1 kriterij MS su imale veći eGDR od ispitanika s 2 ( $z=-2,013$ ,  $P=0,044$ ) i 3 ( $z=-2,605$ ,  $P=0,009$ ) kriterija MS.

Nije nađena statistički značajna razlika između vrijednosti uGLP-1 u 0' i aGLP-1 s obzirom na broj komponenti MS.

**Tablica 24. Koncentracije GLP-1 te eGDR s obzirom na broj kriterija MS (1-3 kriterija: ŠBT1, OS, dislipidemija, povišen krvni tlak); N=30.**

Varijabla	MS 1 kriterij (n=11)	MS 2 kriterija (n=9)	MS 3 kriterija (n=10)	$\chi^2$	P
GLP-1* (pmol/l)					
Ukupni					
0'	0,5 (0-4,7)	0,3 (0-5,5)	0,45 (0-6,4)	0,079	0,961
30'	2,8 (0,5-9,4)*	4,1 (0,6-9,3)	6,55 (1,5-29)*	<b>6,145</b>	<b>0,046</b>
$\Delta$ 30'-0' <sup>†</sup>	2,1 (0,2-5,9) <sup>†</sup>	3,8 (0,3-7,8)	5,95 (-1,9-24,3) <sup>†</sup>	<b>6,269</b>	<b>0,044</b>
Aktivni					
0'	0,3 (0-0,7)	0,1 (0,02-1,7)	0,17 (0,02-1,9)	0,125	0,939
30'	1 (0,4-9,7)	1,6 (0,09-8)	1,15 (0,4-4,8)	0,893	0,64
$\Delta$ 30'-0'	0,9 (0,1-9,3)	1 (-0,31-7,9)	0,91 (-0,5-3,38)	0,287	0,866
eGDR <sup>‡</sup> (mg/kg/min)	9,58 (7,76-11,31) <sup>‡§</sup>	8,78 (6,08-9,83) <sup>‡</sup>	7,07 (3,71-10,85) <sup>§</sup>	<b>8,512</b>	<b>0,014</b>

\*GLP-1- peptid 1 sličan glukagonu; <sup>†</sup> $\Delta$ 30'-0'- razlika između postprandijalne i bazalne koncentracije hormona., <sup>‡</sup>eGDR- prosječna stopa raspoložive glukoze.

#### 5.6.1.1. GLP-1 u binarnoj logističkoj regresiji s obzirom na MS u ispitanika sa ŠBT1

Osobe koje imaju MS su bile značajno starije (49 godina, 34-59 vs 30 godina, 20-59;  $z=-3,258$ ,  $P=0,001$ ), imale su dulje trajanje ŠBT1 (26 godina, 17-45 vs 17 godina, 3-34;  $z=-2,465$ ,  $P=0,014$ ), manji eGDR: 7,07 mg/kg/min, 3,71-10,85 vs 9,42 mg/kg/min, 6,08-11,31 mg/kg/min;  $z=-2,332$ ,  $P=0,02$ ) te slabiju bubrežnu funkciju (eGFR prema CKD EPI: 104 ml/min, 77-119 vs 118 ml/min, 84-133;  $z=-2,907$ ,  $P=0,004$ ) u odnosu na osobe bez MS. Nije bilo razlike u regulaciji glikemije i lipidemiji te potrebi za inzulinom između osoba s i bez MS. Tablica 25. prikazuje binarnu logističku regresiju GLP-1 s obzirom na MS u osoba sa ŠBT1.

**Tablica 25. Binarna logistička regresija GLP-1 s obzirom na MS u osoba sa ŠBT1.**

Nezavisna varijabla	Grubi OR (95%CI)	P	Prilagođen (95% CI)*	OR	P
------------------------	------------------	---	-------------------------	----	---

uGLP-1 <sup>†</sup> 0'	1,049 (0,718-1,531)	0,806	1,169 (0,686-1,994)	0,565
(pmol/l)				
uGLP-1 30'	1,272 (0,99-1,634)	0,06	1,709 (0,867-3,368)	0,122
(pmol/l)				
$\Delta$ uGLP-1	1,311 (0,99-1,737)	0,059	1,301 (0,863-1,962)	0,209
(pmol/l)				
aGLP-1 <sup>‡</sup> 0'	1,524 (0,334-6,955)	0,587	1,661 (0,208-13,297)	0,632
(pmol/l)				
aGLP-1 30'	0,916 (0,616-1,363)	0,665	1,125 (0,527-2,403)	0,761
(pmol/l)				
$\Delta$ aGLP-1	0,891 (0,589-1,347)	0,583	1,04 (0,467-2,317)	0,923
(pmol/l)				

\* prilagođen prema dobi, spolu i trajanju bolesti. <sup>†</sup>uGLP-1-ukupni peptid 1 sličan glukagonu; <sup>‡</sup>aGLP-1- aktivni peptid 1 sličan glukagonu.

## 5.7. Povezanost koncentracija FGF-21 s inzulinskom rezistencijom (eGDR), MS, koncentracijom glukagona u plazmi te inzulinom u ispitanika sa ŠBT1

Tablica 26. prikazuje povezanost koncentracija FGF-21 u serumu s IR te njezinim biljezima, koncentracijom glukagona u plazmi natašte i postprandijalno te dnevnom dozom inzulina, dozom bazalnog inzulina te dozom bolus inzulina u ispitanika sa ŠBT1. Postprandijalna koncentracija FGF-21 statistički značajno pozitivno korelira s bazalnom vrijednosti glukagona ( $\rho=0,363$ ,  $P=0,049$ ). Koncentracija FGF-21 natašte i postprandijalno negativno koreliraju s  $\Delta$  glukagona, no bez statističke značajnosti. Druge statistički značajne povezanosti nisu utvrđene.

**Tablica 26. Povezanost koncentracija čimbenika rasta fibroblasta-21 (FGF-21) u serumu s inzulinskom rezistencijom (eGDR), koncentracijom glukagona u plazmi te dnevnom dozom inzulina u ispitanika sa šećernom bolešću tipa 1 (ŠBT1); Spearmanov test (N=30).**

Varijable u korelaciji	Koeficijent korelacije ( $\rho$ )	P
------------------------	-----------------------------------	---

**FGF-21 \* 0'**

Trigliceridi/HDL <sup>†</sup>	-0,031	0,871
eGDR <sup>‡</sup>	0,285	0,126
glukagon 0'	0,229	0,223
glukagon 30'	-0,022	0,908
$\Delta$ glukagon <sup>§</sup>	-0,345	0,062
Ukupna dnevna doza inzulina (IU/kg/dan)	-0,013	0,947
Dnevna doza bazalnog inzulina	0,051	0,791
Dnevna doza bolus inzulina	-0,091	0,634

**FGF-21 30'**

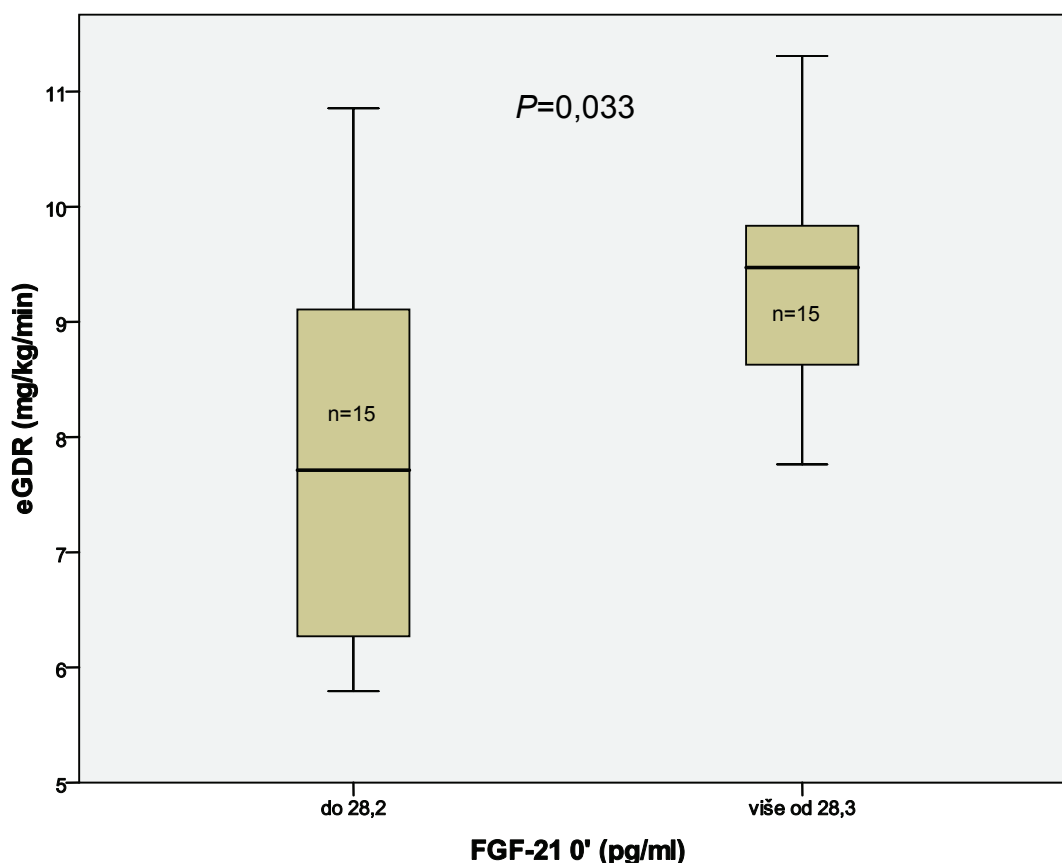
Trigliceridi/HDL	-0,149	0,432
eGDR	0,16	0,398
<b>glukagon 0'</b>	<b>0,363</b>	<b>0,049</b>
glukagon 30'	0,065	0,731
$\Delta$ glukagon	-0,356	0,054
Ukupna dnevna doza inzulina (IU/kg/dan)	0,021	0,914
Dnevna doza bazalnog inzulina	0,041	0,829
Dnevna doza bolus inzulina	-0,077	0,685

\* FGF-21- čimbenik rasta fibroblasta-21, <sup>†</sup>HDL- kolesterol visoke gustoće, <sup>‡</sup>eGDR- prosječna stopa raspoložive glukoze, <sup>§</sup> $\Delta$ glukagon- razlika između glukagona 30' i glukagona 0'.

### 5.7.1. eGDR s obzirom na kategorije vrijednosti FGF-21

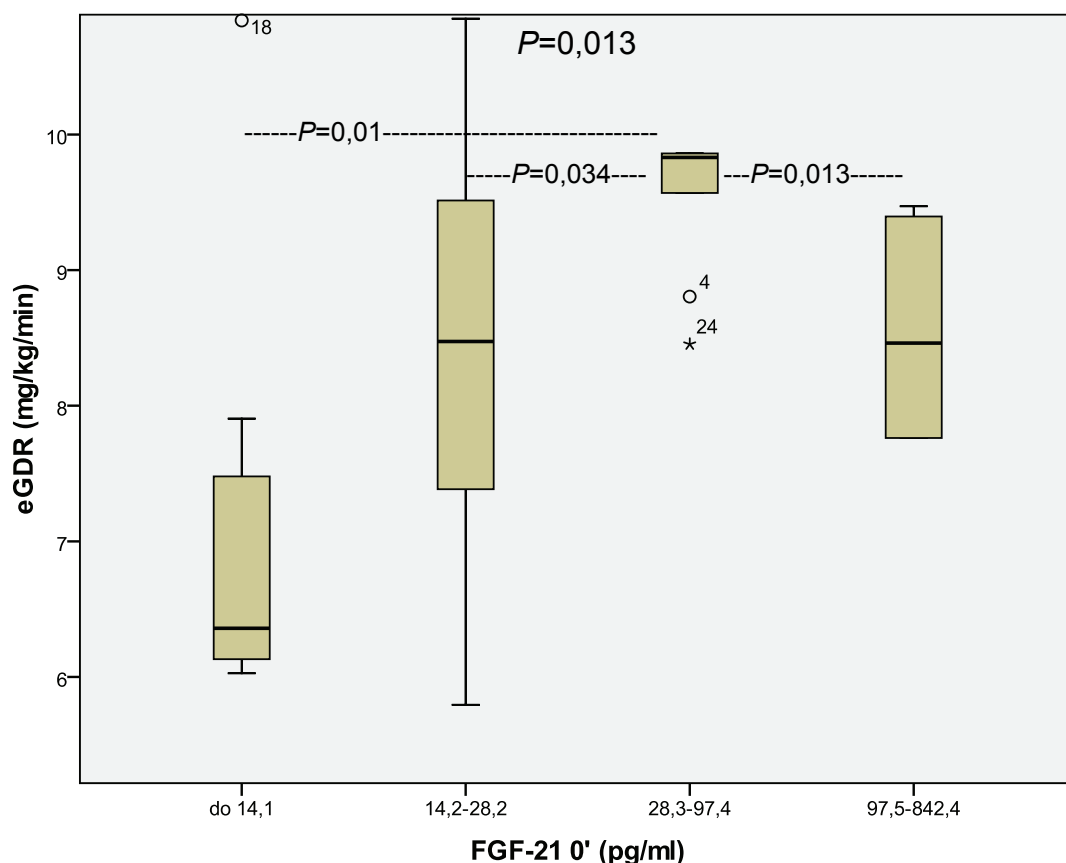
Kada podijelimo ispitanike sa ŠBT1 prema medijanu koncentracije FGF-21 u 0' (28,3 pg/ml) u 2 skupine, u skupini s višom koncentracijom FGF-21 u 0' nađena je statistički značajno veća vrijednosti eGDR u odnosu na skupinu s nižom koncentracijom FGF-21 0' (9,47 mg/kg/min, 3,71-11,31, vs 7,71 mg/kg/min, 5,8-10,85)  $z=-2,136$ ,  $P=0,033$  (Slika 21.).





Slika 21. Prosječna stopa raspoložive glukoze (eGDR) s obzirom na medijan bazalne vrijednosti čimbenika rasta fibroblasta-21 (FGF-21 u 0'), Mann-Whitneyev test (N=30).

Kada podijelimo ispitanike sa ŠBT1 prema kvartilama koncentracija FGF-21 u 0' (kvartila 1= <14,1 pg/ml, kvartila 2= 14,2-28,2 pg/ml, kvartila 3= 28,3-97,4 pg/ml, kvartila 4= 97,5-842,4 pg/ml) dobijemo statistički značajnu razliku u vrijednosti eGDR između kvartila FGF-21 0',  $\chi^2=10,812$ ,  $P=0,013$ . *Post hoc* Mann-Whitneyevim testom smo utvrdili razliku između kvartila 1 i 3 (6,36 mg/kg/min, od 6,03 do 10,84 vs 9,83 mg/kg/min, od 8,45 do 11,31;  $z=-2,593$ ,  $P=0,01$ ), 2 i 3 (8,47 mg/kg/min, od 5,79 do 10,85 vs 9,83 mg/kg/min, od 8,45 do 11,31;  $z=-2,117$ ,  $P=0,034$ ) te 3 i 4 (9,83 mg/kg/min, od 8,45 do 11,31 vs 8,46 mg/kg/min, od 3,71 do 9,47;  $z=-2,475$ ,  $P=0,013$ ) (Slika 22.).



Slika 22. Prosječna stopa raspoložive glukoze (eGDR) s obzirom na kvartile bazalne vrijednosti čimbenika rasta fibroblasta-21 (FGF-21 0'), Kruskal-Wallisov test, *post hoc* Mann-Whitneyev test (N=30).

### 5.7.2. FGF-21 s obzirom na MS prema NCEP:ATPIII kriterijima

Mann-Whitneyevim testom ispitana je razlika u koncentracijama FGF-21 između osoba koje imaju i onih koji nemaju MS (Tablica 27.). Nije nađena statistički značajna razlika između vrijednosti FGF-21 s obzirom na prisutnost MS.

Tablica 27. Povezanost koncentracija čimbenika rasta fibroblasta-21 u serumu s MS prema NCEP:ATPIII kriterijima (N=30, Mann-Whitney test).

Varijabla	S metaboličkim sindromom (n=10)	Bez metaboličkog sindroma (n=20)	z	P
FGF-21* (pg/ml)				

0'	19,35 (0-124,8)	29,65 (1,2-842,4)	-0,88	0,379
30'	20,2 (0-167,1)	40,4 (0,3-946)	-0,264	0,792
$\Delta$ 30'-0' <sup>†</sup>	0,35 (-15,3-60,5)	-3,25 (-53,9-103,6)	-0,902	0,367

\* FGF-21- čimbenik rasta fibroblasta-21; <sup>†</sup>  $\Delta$ 30'-0'- razlika između postprandijalne i bazalne koncentracije hormona.

Nije nađena statistički značajna razlika između vrijednosti FGF-21 s obzirom na broj komponenti MS (Tablica 28.).

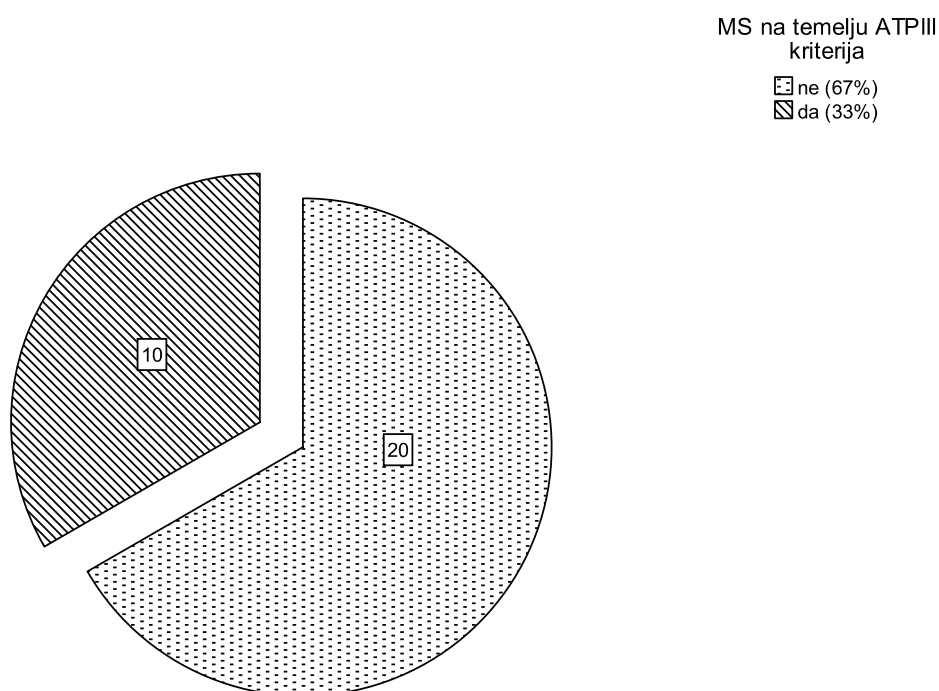
**Tablica 28. Koncentracije FGF-21 s obzirom na broj kriterija MS (1-3 kriterija: ŠBT1, OS, dislipidemija, povišen krvni tlak); N=30.**

Varijabla	MS 1 kriterij (n=11)	MS 2 kriterija (n=9)	MS 3 kriterija (n=10)	$\chi^2$	P
FGF-21 <sup>*</sup> (pg/ml)					
0'	51,4 (13,8-842,4)	26,6 (1,2-135,4)	19,35 (0-124,8)	2,339	0,311
30'	63,9 (9,5-946)	31,8 (0,3-161,8)	20,2 (0-167,1)	0,933	0,627
$\Delta$ 30'-0' <sup>†</sup>	-7,4 (-53,9-103,6)	-0,3 (-31,2-61,7)	0,35 (-15,3-60,5)	1,458	0,482

\* FGF-21- čimbenik rasta fibroblasta-21; <sup>†</sup>  $\Delta$ 30'-0'- razlika između postprandijalne i bazalne koncentracije hormona.

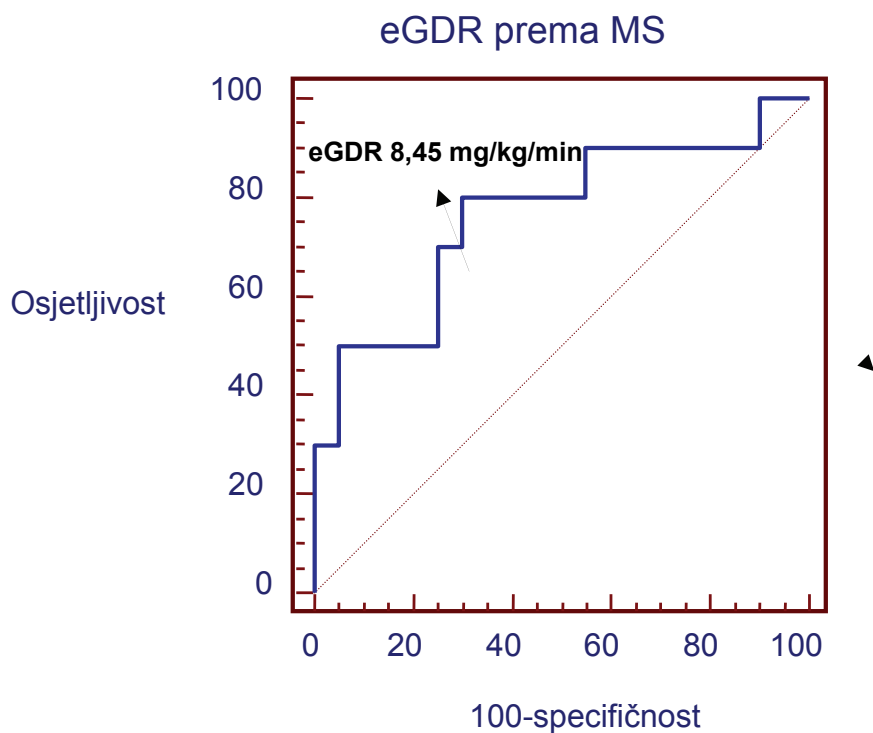
## 5.8. Analiza GLP-1 i FGF-21 s obzirom na prisutnost MS prema eGDR

Prema kriterijima NCEP:ATPIII za računanje prevalencije MS 10 (33%) ispitanika sa ŠBT1 je imalo MS (Slika 23.).



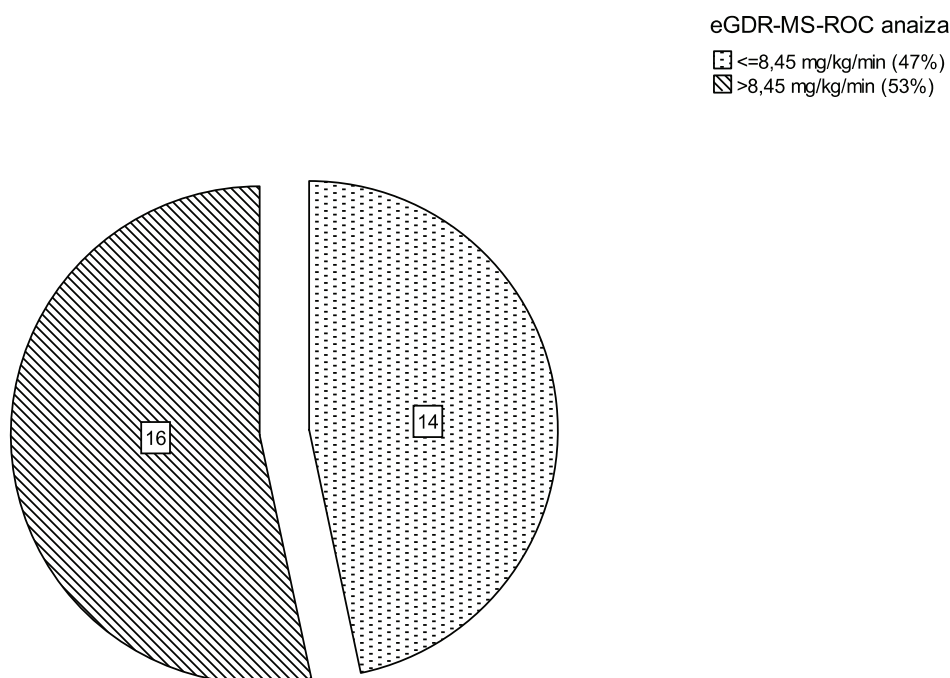
Slika 23. Prisutnost metaboličkog sindroma (MS) na temelju NCEP:ATP III kriterija (eng. „*National Cholesterol Education Program:Adult Treatment Panel III*“) u ispitanika sa šećernom bolesti tipa 1, N=30. Brojevi unutar dijelova pite su broj ispitanika.

Da bismo dobili najprikladniju vrijednost eGDR koja bi bila granična vrijednost između osoba s i bez MS učinili smo ROC analizu te dobili vrijednost  $eGDR \leq 8,45$  mg/kg/min kao graničnu vrijednost (osjetljivost 80%, specifičnost 73,7%,  $z=3,029$ ,  $P=0,0025$ , CI 0,575-0,899), odnosno pri toj je vrijednosti optimalna osjetljivost i specifičnost kojom eGDR predviđa MS (prethodno standardno određen prema NCEP:ATPIII kriterijima) (Slika 24.).



Slika 24. ROC (eng. *receiving operating characteristics*) analiza za vrijednost prosječne stope raspoložive glukoze (eGDR) u ovisnosti o postojanju metaboličkog sindroma (MS) prema NCEP:ATPIII (eng. „*National Cholesterol Education Program:Adult Treatment Panel III*“) kriterijima u ispitanika sa šećernom bolesti tipa 1, N=30.

Ako se kao kriterij za MS uzme ova vrijednost eGDR ( $\leq 8,45$  mg/kg/min), tada je MS imalo 14 (47%) ispitanika sa ŠBT1 (Slika 25.).

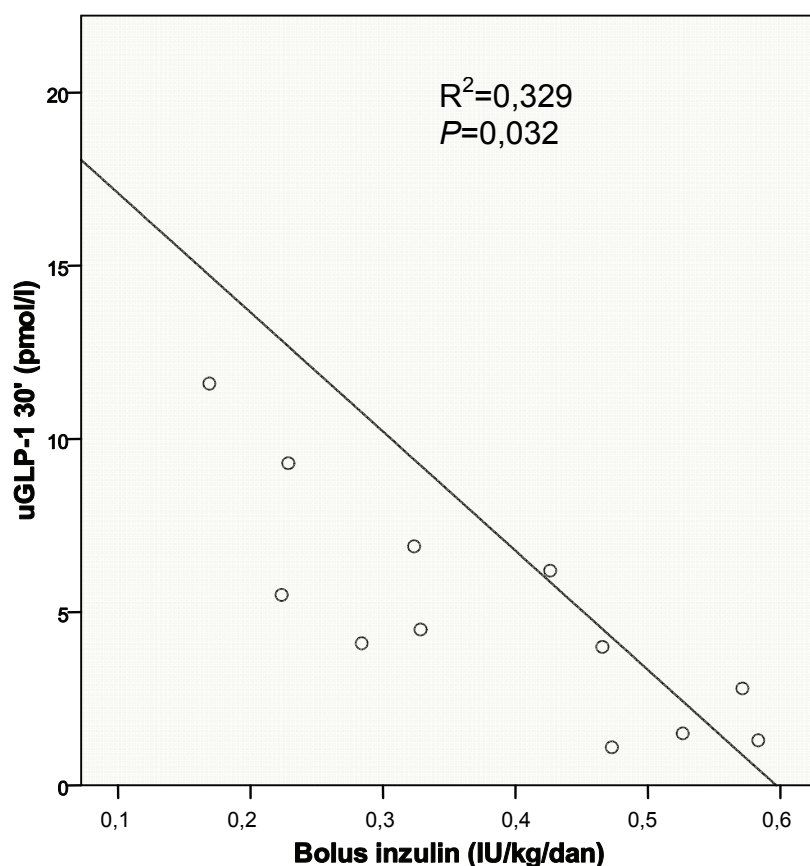


Slika 25. Podjela ispitanika sa šećernom bolesti tipa 1 s obzirom na postojanje metaboličkog sindroma (MS) prema kriteriju rezne granične vrijednosti prosječne stope raspoložive glukoze (eGDR) dobivene ROC (eng. *receiveng operating characteristics*) analizom. Brojevi unutar dijelova pite su broj ispitanika.

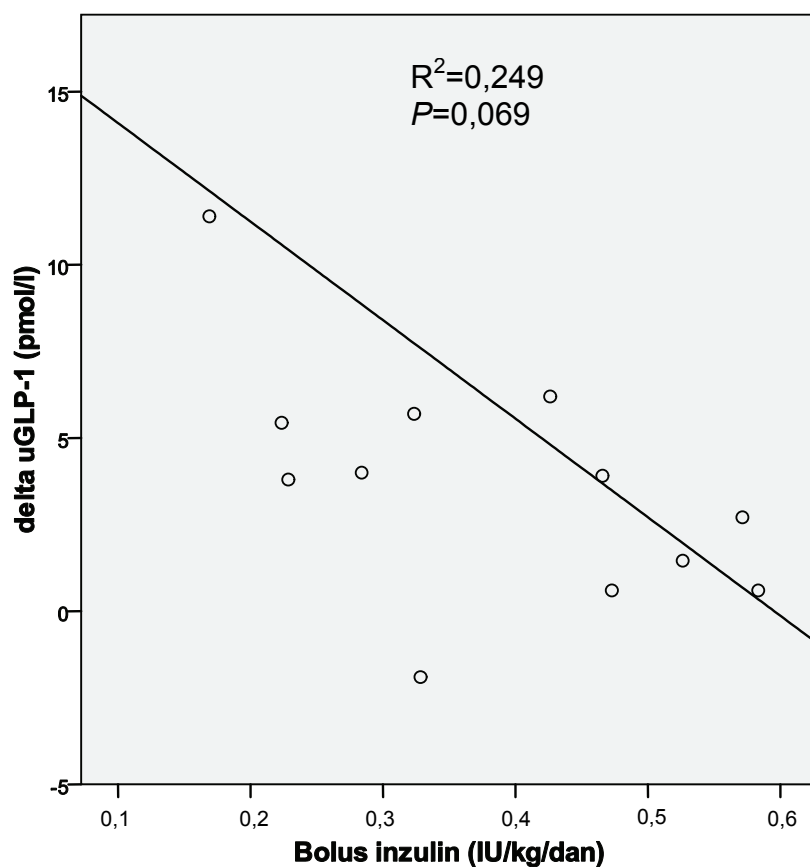
Prema graničnoj vrijednosti eGDR na temelju ROC analize razvrstani su ispitanici u 2 skupine (eGDR ≤8,45 mg/kg/min i eGDR>8,45 mg/kg/min). Ispitana je povezanost (Spearmanov test) između koncentracija GLP-1 (uGLP-1 i aGLP-1) i FGF-21 i regulacije glikemije, lipidemije, dnevne doze inzulina prema kilogramima TM i koncentracije glukagona u pojedinačnih skupina s obzirom na eGDR, te smo također ispitano postoji li razlika u pojedinačnih skupina s obzirom na eGDR u koncentraciji navedenih hormona između ispitanika sa ŠBT1 i zdravih kontrolnih ispitanika.

**U skupini ispitanika sa ŠBT1 koja ima eGDR≤8,45 mg/kg/min** uGLP-1 u 0' statistički granično pozitivno korelira s FGF-21 u 30' ( $p=0,521$ ,  $P=0,056$ ), a uGLP-1 u 30' statistički značajno negativno korelira s ukupnom dnevnom dozom inzulina ( $p=-0,837$ ,  $P<0,001$ ) te dnevnom dozom bolus inzulina ( $p=-$

0,785,  $P=0,001$ ) (Slika 26.). U toj skupini  $\Delta$  uGLP-1 statistički značajno negativno korelira s ukupnom dnevnom dozom inzulina ( $\rho=-0,706$ ,  $P=0,005$ ), dnevnom dozom bazalnog inzulina ( $\rho=-0,565$ ,  $P=0,035$ ) (Slika 27.) te dnevnom dozom bolus inzulina ( $\rho=-0,629$ ,  $P=0,016$ ) (Slika 28.) te statistički značajno negativno s  $\Delta$  FGF-21 ( $\rho=-0,577$ ,  $P=0,039$ ). Koncentracija aGLP-1 u 0' ne korelira statistički značajno niti s jednom ispitivanom varijablom, dok aGLP-1 u 30' statistički granično pozitivno korelira s FGF-21 0' ( $\rho=0,5$ ,  $P=0,069$ ), statistički značajno pozitivno s FGF-21 u 30' ( $\rho=0,542$ ,  $P=0,048$ ) te statistički granično negativno s  $\Delta$  glukagonom ( $\rho=-0,504$ ,  $P=0,066$ ).

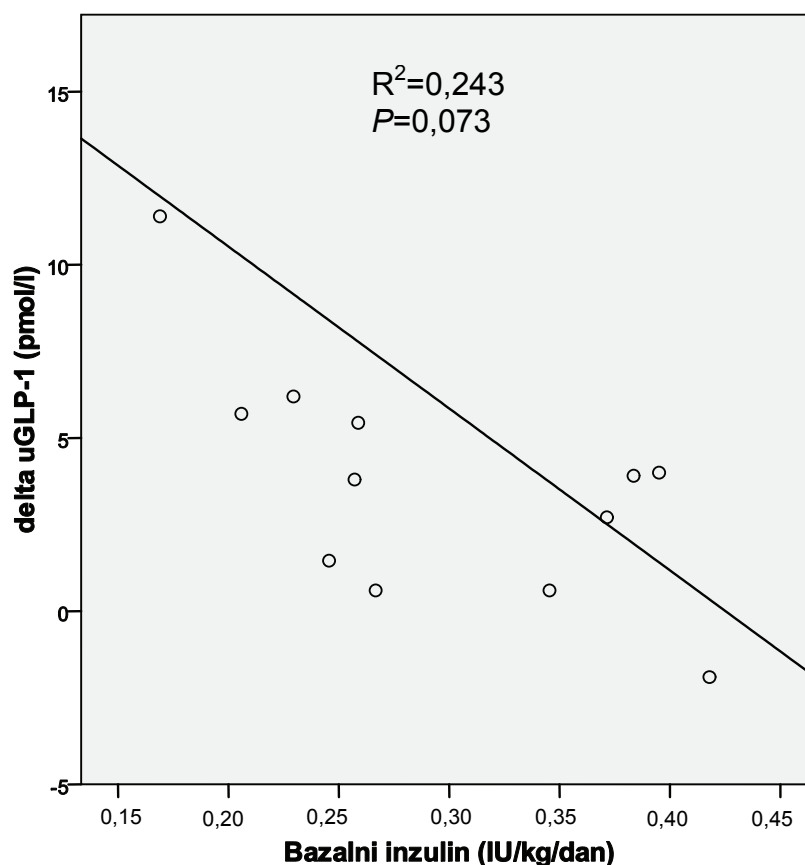


Slika 26. Povezanost postprandijalne koncentracije peptida 1 sličnog glukagonu (uGLP-1 30') s dozom bolus inzulina u ispitanika sa šećernom bolesti tipa 1 s prosječnom stopom raspoložive glukoze ( $eGDR \leq 8,45$  mg/kg/min), ( $n=14$ , linearna regresija); jednačba pravca ( $uGLP-1\ 30' = -34,403 \cdot \text{bolus inzulini} + 20,536$ ).



Slika 27. Povezanost koncentracije delta ukupnog peptida 1 sličnog glukagonu ( $\Delta$  uGLP-1) s bolus inzulinom u ispitanika sa šećernom bolesti tipa 1 s prosječnom stopom raspoložive glukoze ( $eGDR \leq 8,45$  mg/kg/min), ( $n=14$ , linearna regresija); jednačba pravca ( $\Delta$  uGLP-1 =  $-28,433 \cdot \text{bolus inzulin} + 16,937$ ).

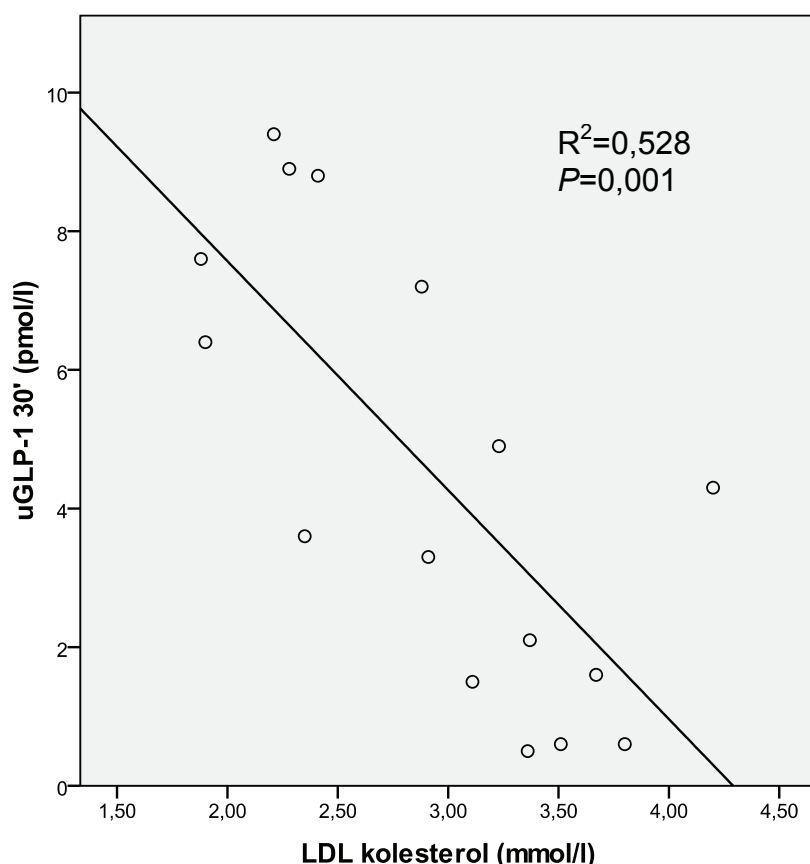




Slika 28. Povezanost koncentracije delta ukupnog peptida 1 sličnog glukagonu ( $\Delta$  uGLP-1) s bazalnim inzulinom u ispitanika sa šećernom bolesti tipa 1 s prosječnom stopom raspoložive glukoze ( $\text{eGDR} \leq 8,45 \text{ mg/kg/min}$ ), ( $n=14$ , linearna regresija); jednačba pravca ( $\Delta \text{uGLP-1} = -46,746 \cdot \text{bazalni inzulin} + 19,877$ ).

**U skupini ispitanika sa ŠBT1 koja ima  $\text{eGDR} > 8,45 \text{ mg/kg/min}$  uGLP-1 u 0'** statistički značajno negativno korelira s GUP u 0' ( $\rho = -0,507$ ,  $P = 0,045$ ), ukupnim kolesterolom ( $\rho = -0,527$ ,  $P = 0,036$ ), HDL ( $\rho = -0,612$ ,  $P = 0,012$ ) te HDL3 kolesterolom ( $\rho = -0,51$ ,  $P = 0,044$ ). Ukupni GLP-1 30' statistički značajno negativno korelira s ukupnim kolesterolom ( $\rho = -0,703$ ,  $P = 0,002$ ), HDL- ( $\rho = -0,557$ ,  $P = 0,027$ ) te LDL kolesterolom ( $\rho = -0,724$ ,  $P = 0,02$ ) (Slika 29.) te statistički značajno negativno s ne-HDL kolesterolom ( $\rho = -0,613$ ,  $P = 0,012$ ).  $\Delta$  uGLP-1 statistički značajno pozitivno korelira s ukupnom dozom inzulina ( $\rho = 0,503$ ,  $P = 0,047$ ), dnevnom dozom bolus inzulina ( $\rho = 0,529$ ,  $P = 0,035$ ) te negativno s ukupnim kolesterolom ( $\rho = -0,535$ ,  $P = 0,033$ ), ne-HDL kolesterolom ( $\rho = -0,531$ ,  $P = 0,034$ ) i LDL kolesterolom ( $\rho = -0,547$ ,  $P = 0,028$ ). Koncentracija aGLP-1 0' statistički značajno negativno korelira s HDL3 kolesterolom ( $\rho = -0,614$ ,  $P = 0,011$ ); aGLP-1 30' statistički značajno negativno s ukupnim kolesterolom

( $p=-0,711$ ,  $P=0,002$ ), HDL kolesterolom ( $p=-0,633$ ,  $P=0,008$ ), HDL3 kolesterolom ( $p=-0,619$ ,  $P=0,011$ ), LDL kolesterolom ( $p=-0,617$ ,  $P=0,011$ ) i ne-HDL kolesterolom ( $p=-0,503$ ,  $P=0,047$ ).  $\Delta$  aGLP-1 statistički značajno negativno korelira s ukupnim kolesterolom ( $p=-0,633$ ,  $P=0,009$ ) te LDL kolesterolom ( $p=-0,605$ ,  $P=0,013$ ). Koncentracija FGF-21 u 0' statistički značajno pozitivno korelira s HDL kolesterolom ( $p=0,535$ ,  $P=0,033$ ), HDL3 kolesterolom ( $p=0,536$ ,  $P=0,032$ ) te negativno s LDL/HDL kolesterolom ( $p=-0,703$ ,  $P=0,002$ ). FGF-21 u 30' statistički značajno pozitivno korelira s HDL3 kolesterolom ( $p=0,547$ ,  $P=0,028$ ) te negativno s LDL/HDL kolesterolom ( $p=-0,562$ ,  $P=0,024$ ).



Slika 29. Povezanost postprandijalne koncentracije ukupnog peptida 1 sličnog glukagonu (uGLP-1 30') s kolesterolom male gustoće (LDL kolesterol) u ispitanika sa šećernom bolesti tipa 1 s prosječnom stopom raspoložive glukoze (eGDR>8,45 mg/kg/min), (n=16, linearna regresija); jednačba pravca ( $\text{uGLP-1 } 30' = -3,304 \cdot \text{LDL kolesterol} + 14,176$ ).

Mann-Whitneyevim testom je ispitana razlika u koncentraciji GLP-1 (uGLP-1 i aGLP-1) i u FGF-21 između ispitanika sa ŠBT1 te zdravih kontrolnih ispitanika, s tim da su ispitanici sa ŠBT1 bili prethodno podijeljeni u skupine prema eGDR.

Osobe s  $eGDR \leq 8,45$  mg/kg/min su imale statistički značajnu razliku u vrijednosti uGLP-1 u 0' (3,23 pmol/l, od 0,2 do 5,5 vs 0,2 pmol/l, od 0 do 6,4;  $z = -2,258$ ,  $P = 0,024$ ), aGLP-1 u 0' (0,8 pmol/l, od 0,2 do 3,6 vs 0,1 pmol/l, od 0,02 do 1,9;  $z = -3,379$ ,  $P = 0,001$ ), FGF-21 u 0' (86,9 pg/ml, od 0 do 240,7 vs 24,5 pg/ml, od 0 do 842,2;  $z = -2,079$ ,  $P = 0,038$ ) te  $\Delta FGF-21$  (-20,1 pg/ml, od -104,2 do 0,7 vs 0,35 pg/ml, od -15,4 do 103,6;  $z = -3,151$ ,  $P = 0,002$ ). Uočena je veća koncentracija navedenih hormona u zdravih kontrolnih ispitanika u odnosu na ispitanike sa ŠBT1 te veći postprandijalni pad koncentracije FGF-21 u zdravih kontrolnih ispitanika. Ispitanici sa ŠBT1 i  $eGDR > 8,45$  mg/kg/min su imali statistički značajnu razliku u koncentraciji uGLP-1 u 0' (3,23 pmol/l, od 0,2 do 5,5 vs 0,6 pmol/l, od 0 do 5,5;  $z = -2,455$ ,  $P = 0,014$ ) i aGLP-1 0' (0,8 pmol/l, od 0,2 do 3,6 vs 0,35 pmol/l, od 0 do 1,7;  $z = -2,671$ ,  $P = 0,008$ ), međutim, nije bilo statistički značajne razlike u koncentraciji FGF-21 u 0' niti u  $\Delta FGF-21$  između tih ispitanika sa ŠBT1 i zdravih.

#### **5.8.1. MS, eGDR i kalorijska vrijednost doručka u ispitanika sa ŠBT1**

Nije nađena statistički značajna razlika u kalorijskoj vrijednosti doručka između skupine sa i bez MS ( $\chi^2 = 1,821$ ,  $P = 0,61$ ;  $\chi^2$  test). Također nije nađena statistički značajna razlika u vrijednosti eGDR između 4 skupine s obzirom na kalorijsku vrijednost doručka ( $\chi^2 = 3,519$ ,  $P = 0,318$ ; Kruskal-Wallisov test).

#### **5.8.2. MS i eGDR s glikemijom, lipidemijom i mikrovaskularnim komplikacijama u ispitanika sa ŠBT1**

Bolesnici s MS nisu se statistički značajno razlikovali u parametrima glikemije i lipidemije od ispitanika bez MS. Vrijednost eGDR nije korelirala statistički značajno s parametrima glikemije i lipidemije. Ispitan je odnos MS s mikrovaskularnim komplikacijama u ispitanika sa ŠBT1. Osobe koje su imale MS su imale statistički značajno veću prevalenciju dijabetičke retinopatije od osoba bez MS ( $\chi^2 = 8,103$ , Fisherov test  $P = 0,007$ ). Nije nađena statistički značajna razlika u prevalenciji dijabetičke nefropatije i dijabetičke neuropatije

između skupina s i bez MS. Odnos mikrovaskularnih komplikacija s IR, odnosno vrijednošću eGDR nađen je statistički značajnim. Osobe koje su imale dijabetičku nefropatiju imale su niže vrijednosti eGDR= 7,71 mg/kg/min (5,8-7,9) u odnosu na osobe bez dijabetičke nefropatije eGDR= 9,4 mg/kg/min (3,71-11,31),  $z=-2,309$ ,  $P= 0,021$ , Mann-Whitneyev test. Ispitanici s dijabetičkom retinopatijom imale su također statistički značajno niže vrijednosti eGDR (7,38 mg/kg/min, 3,71-11,04) nego ispitanici bez dijabetičke retinopatije eGDR (9,5 mg/kg/min, 7,76-11,31),  $z=-2,744$ ,  $P=0,006$ , Mann-Whitneyev test. Nije bilo statistički značajne razlike u vrijednosti eGDR između osoba s i bez dijabetičke neuropatije ( $z=-1,454$ ,  $P=0,146$ ; Mann-Whitneyev test), iako su osobe s dijabetičkom neuropatijom imale niži medijan vrijednosti eGDR (8,31 mg/kg/min, 5,79-11,31) u odnosu na one bez dijabetičke neuropatije (9,72 mg/kg/min, 3,71-11,04).

### 5.9. Usporedba GLP-1 u plazmi u ispitanika sa ŠBT1 i u zdravih kontrolnih ispitanika

Tablica 29. prikazuje u ispitanika sa ŠBT1 i u zdravih kontrolnih ispitanika plazmatske koncentracije uGLP-1 u 0', 30' te razliku između vrijednosti u 0' i 30' (delta,  $\Delta$ ) i aGLP-1 u 0', 30' i  $\Delta$ . U ispitanika sa ŠBT1 medijan koncentracije uGLP-1 u 0' bio je 0,4 pmol/l (0-6,4), a u zdravih kontrolnih ispitanika 3,23 pmol/l (0,2-5,5). Medijan koncentracije uGLP-1 u 30' u ispitanika sa ŠBT1 bio je 4,4 pmol/l (0,5-29), a u zdravih kontrolnih ispitanika 4,1 pmol/l (1,6-10,9). Medijan  $\Delta$  uGLP-1 u osoba sa ŠBT1 bio je 3,5 pmol/l (-1,9-24,3), a u zdravih kontrolnih ispitanika 1,7 pmol/l (0,7-6).

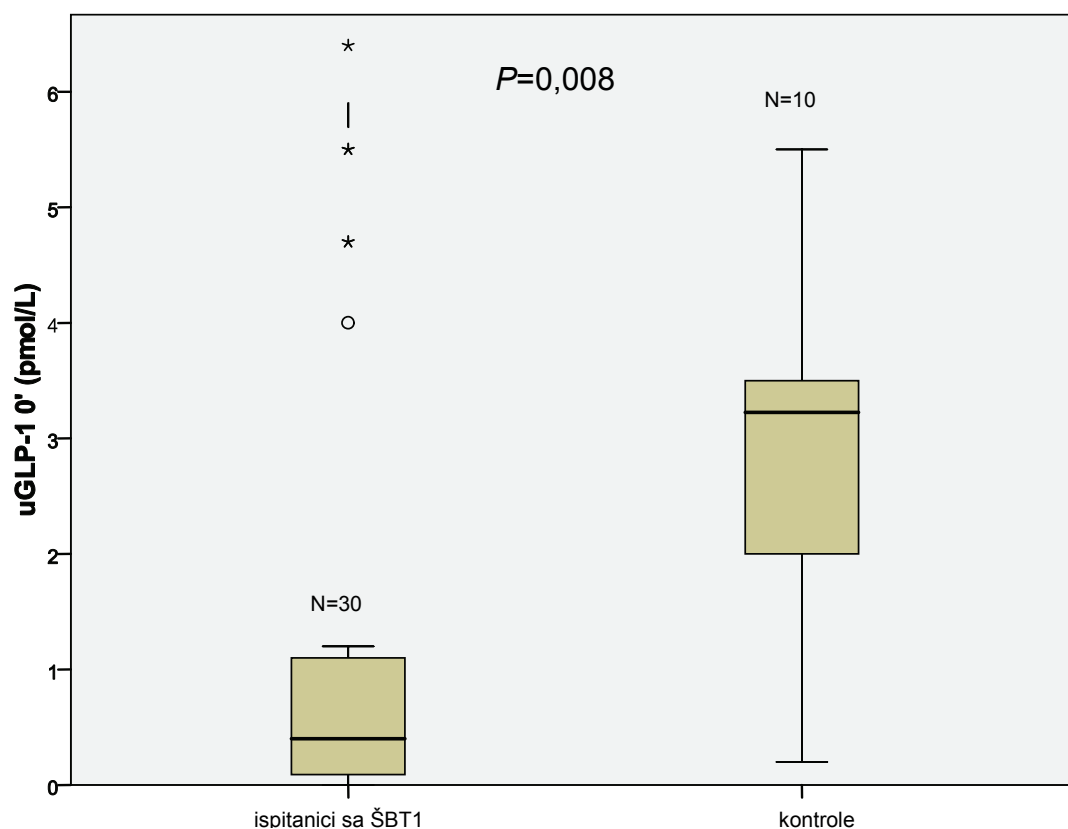
U osoba sa ŠBT1 medijan koncentracije aGLP-1 u 0' bio je 0,2 pmol/l (0-1,9), a u zdravih kontrolnih ispitanika 0,8 pmol/l (0,2-3,6). Medijan koncentracije uGLP-1 u 30' u osoba sa ŠBT1 bio je 1,25 pmol/l (0,09-9,7), a u zdravih kontrolnih ispitanika 1,65 pmol/l (0,5-6,6). Medijan  $\Delta$  aGLP-1 u osoba sa ŠBT1 bio je 0,91 pmol/l (-0,5-9,3), a u zdravih kontrolnih ispitanika 0,65 pmol/l (0,1-3,4). Neparametrijski Mann-Whitneyev test učinjen je radi ispitivanja razlika u koncentraciji navedenih hormona između osoba sa ŠBT1 i zdravih kontrolnih ispitanika (Tablica 29.). Statistički značajno manju bazalnu koncentraciju

ukupnog ( $z=-2,66$ ,  $P=0,08$ ) i aktivnog ( $z=-3,387$ ,  $P=0,001$ ) GLP-1 u 0' imale su osobe sa ŠBT1 (Slike 30. i 31.). Nije bilo statistički značajne razlike u postprandijalnim koncentracijama ukupnog i aktivnog GLP-1, kao niti u  $\Delta$  ukupnog i aktivnog GLP-1 između ispitanika sa ŠBT1 i zdravih kontrola. Wilcoxonovim testom ispitana je razlika između bazalnih i postprandijalnih vrijednosti hormona u osoba sa ŠBT1 (Tablica 29.). Postprandijalna vrijednost ukupnog ( $z=-4,577$ ,  $P<0,001$ ) i aktivnog ( $z=-4,413$ ,  $P<0,001$ ) GLP-1 bila je statistički značajno viša od vrijednosti natašte (Slike 32. i 33.). Samo je jedna osoba imala nižu postprandijalnu vrijednost uGLP-1 od one natašte, dok su 3 osobe imale nižu postprandijalnu vrijednost aGLP-1 u odnosu na bazalni (ovi rezultati nisu prikazani tablično). U zdravih kontrolnih ispitanika između bazalne i postprandijalne vrijednosti ukupnog ( $z=-2,803$ ,  $P=0,005$ ) i aktivnog ( $z=-2,807$ ,  $P=0,005$ ) GLP-1 (Slike 32. i 33.) nađena je statistički značajna razlika. Postprandijalna vrijednost ukupnog i aktivnog GLP-1 bila je statistički značajno viša od vrijednosti natašte.

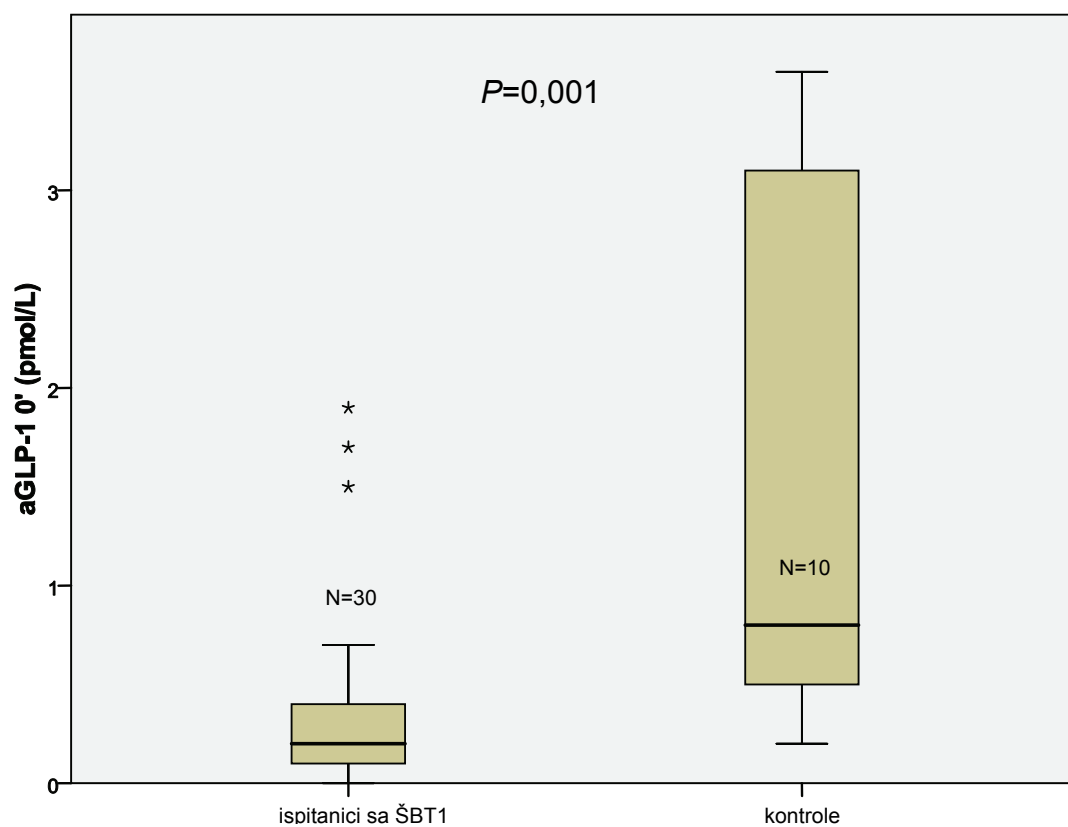
**Tablica 29. Razlike u plazmatskim koncentracijama GLP-1 između ispitanika sa šećernom bolesti tipa 1 (ŠBT1) i zdravih kontrolnih ispitanika (Mann-Whitneyev test) i razlike između bazalnih i postprandijalnih vrijednosti navedenih hormona (Wilcoxonov test).**

Varijabla	Ispitanici sa ŠBT1 (N=30)	Zdravi kontrolni ispitanici (N=10)	z	P
GLP-1* (pmol/l)				
Ukupni				
0'	0,4 (0-6,4) <sup>‡</sup>	3,23 (0,2-5,5) <sup>¶</sup>	<b>-2,66</b>	<b>0,008</b>
30'	4,4 (0,5-29) <sup>‡</sup>	4,1 (1,6-10,9) <sup>¶</sup>	-0,125	0,901
$\Delta$ 30'-0' <sup>†</sup>	3,5 (-1,9-24,3)	1,7 (0,7-6)	-1,203	0,229
Aktivni				
0'	0,2 (0-1,9) <sup>¶</sup>	0,8 (0,2-3,6) <sup>**</sup>	<b>-3,387</b>	<b>0,001</b>
30'	1,25 (0,09-9,7) <sup>¶</sup>	1,65 (0,5-6,6) <sup>**</sup>	-1,063	0,288
$\Delta$ 30'-0'	0,91 (-0,5-9,3)	0,65 (0,1-3,4)	-0,579	0,563

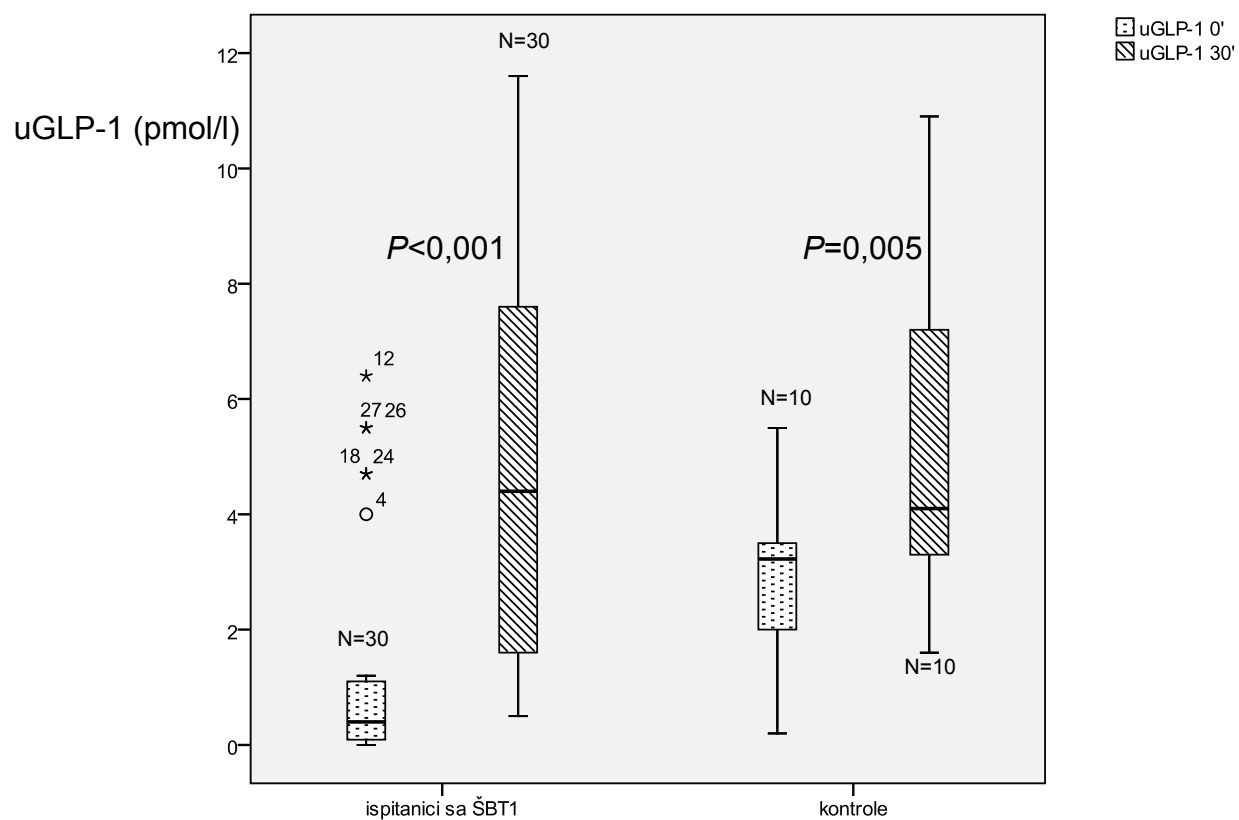
\*GLP-1- peptid 1 sličan glukagonu; <sup>†</sup> $\Delta$ 30'-0'- razlika između postprandijalne i bazalne koncentracije hormona, <sup>‡</sup> $z=-4,577$ ,  $P<0,001$ , <sup>¶</sup> $z=-4,413$ ,  $P<0,001$ , <sup>¶</sup> $z=-2,803$ ,  $P=0,005$ , <sup>\*\*</sup> $z=-2,807$ ,  $P=0,005$ .



Slika 30. Bazalna koncentracija ukupnog peptida 1 sličnoga glukagonu (uGLP-1 0') u ispitanika sa šećernom bolesti tipa 1 (ŠBT1) i zdravih kontrolnih ispitanika (kontrole) (N=40; Mann-Whitneyev test).

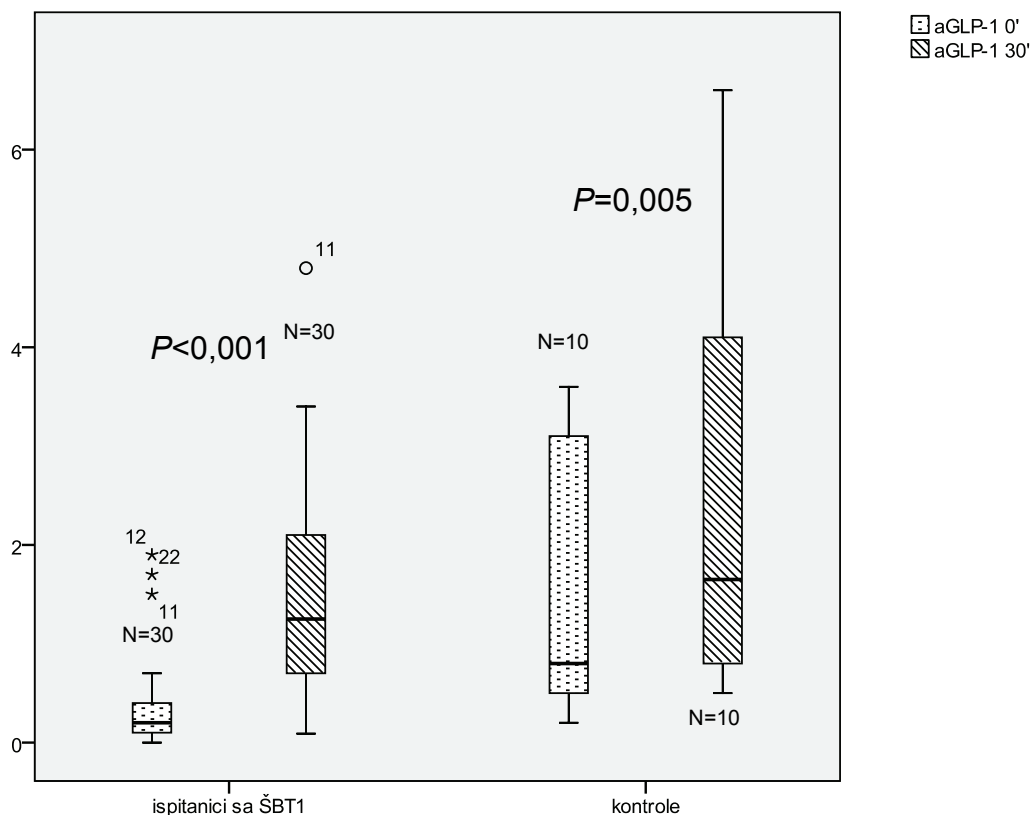


Slika 31. Bazalna koncentracija aktivnog peptida 1 sličnoga glukagonu (aGLP-1 0') u ispitanika sa šećernom bolesti tipa 1 (ŠBT1) i zdravih kontrolnih ispitanika (kontrole) (N=40; Mann-Whitneyev test).



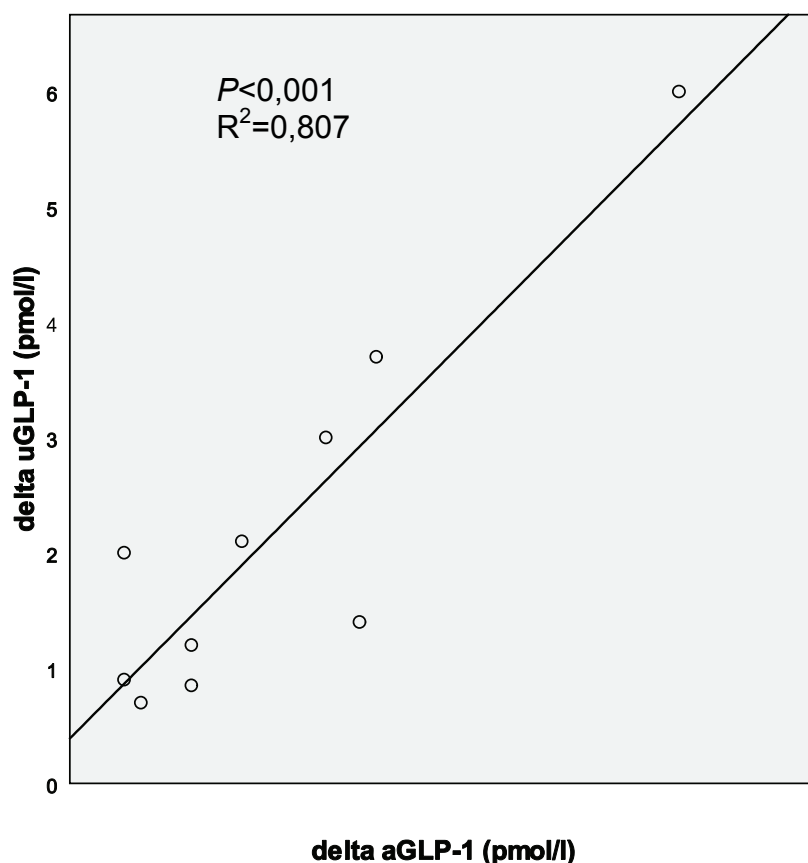
Slika 32. Bazalne i postprandijalne koncentracije ukupnog peptida 1 sličnoga glukagonu (uGLP-1 u 0' i 30') u ispitanika sa šećernom bolesti tipa 1 (ŠBT1) (N=30; Wilcoxonov test) i zdravih kontrolnih ispitanika (kontrole) (N=10; Wilcoxonov test).





Slika 33. Bazalne i postprandijalne koncentracije aktivnog peptida 1 sličnoga glukagonu (aGLP-1 u 0' i 30') u ispitanika sa šećernom bolesti tipa 1 (ŠBT1) (N=30; Wilcoxonov test) i zdravih kontrolnih ispitanika (kontrolne) (N=10; Wilcoxonov test).

Ukupni GLP-1 0' u osoba sa ŠBT1 statistički značajno pozitivno korelira s aGLP-1 0' ( $\tau=0,271$ ,  $P=0,045$ ), uGLP-1 30' s aGLP-1 30' također ( $\tau=0,36$ ,  $P=0,006$ ), kao i  $\Delta$  uGLP-1 s  $\Delta$  aGLP-1 ( $\tau=0,278$ ,  $P=0,032$ ). U zdravih kontrolnih ispitanika ove su korelacije također bile pozitivne, no statistički značajne samo za  $\Delta$  uGLP-1 s  $\Delta$  aGLP-1 ( $\tau=0,644$ ,  $P=0,009$ ). Linearna regresijska analiza nije pokazala statistički značajnu linearnu povezanost između navedenih mjerenja hormona u ispitanika sa ŠBT1. U zdravih kontrolnih ispitanika linearna regresijska analiza pokazala je statističku značajnost između  $\Delta$  uGLP-1 i  $\Delta$  aGLP-1,  $P<0,001$ ,  $R^2=0,807$  ( $\Delta$  uGLP-1= $1,469 \cdot \Delta$  aGLP-1+0,716) (Slika 34.).



Slika 34. Linearna regresija između delta ukupnog peptida 1 sličnog glukagonu i aktivnog peptida 1 sličnog glukagonu ( $\Delta$  uGLP-1 i  $\Delta$  aGLP-1) u zdravih kontrolnih ispitanika (N=10).

#### 5.9.1. GLP-1 u binarnoj logističkoj regresiji s obzirom na osnovnu skupinu ispitanika (ispitanici sa ŠBT1 i zdravi kontrolni ispitanici)

Nije bilo statistički značajne razlike u univarijatnoj statistici u dobi, spolu i ITM između ispitanika sa ŠBT1 i zdravih kontrolnih ispitanika. Tablica 30. prikazuje binarnu logističku regresiju GLP-1 s obzirom na osnovnu skupinu ispitanika (ispitanici sa ŠBT1 i zdravi kontrolni ispitanici).

Binarna logistička regresija je učinjena za uGLP-1 0' s obzirom na zavisnu, dihotomnu varijablu skupina ispitanika (1=osobe sa ŠBT1, 2=zdravi kontrolni ispitanici). Grubi model pokazuje statistički značajnu razliku, OR=1,493, CI 1,04-2,145. Drugi stupac, nakon prilagodbe prema dobi, spolu i ITM, pokazuje statistički značajnu razliku. Koncentracija uGLP-1 0' je ostala neovisno viša u zdravih kontrolnih ispitanika OR=2,469, CI 1,218-5,008.

Binarna logistička regresija je također učinjena za aGLP-1 u 0' s obzirom na zavisnu, dihotomnu varijablu skupina ispitanika. Grubi model pokazuje statistički značajnu razliku, OR=4,332, CI 1,442-13,012. Drugi stupac, nakon prilagodbe prema dobi, spolu i ITM, pokazuje statistički značajnu razliku. Koncentracija aGLP-1 0' je ostala neovisno viša u zdravih kontrolnih ispitanika OR=8,918, CI 1,472-51,787.

**Tablica 30. Binarna logistička regresija GLP-1 s obzirom na osnovnu skupinu ispitanika (ispitanici sa ŠBT1 i zdravi kontrolni ispitanici).**

Nezavisna varijabla	Grubi OR (95%CI)	P	Prilagođen OR (95% CI)*	P
<b>uGLP-1<sup>†</sup> 0'</b> (pmol/l)	<b>1,493</b> (1,04-2,145)	<b>0,03</b>	<b>2,469</b> (1,218-5,008)	<b>0,012</b>
uGLP-1 30' (pmol/l)	0,967 (0,834-1,123)	0,662	1,017 (0,857-1,205)	0,85
$\Delta$ uGLP-1 (pmol/l)	0,818 (0,605-1,106)	0,192	0,835 (0,604-1,155)	0,276
<b>aGLP-1<sup>‡</sup> 0'</b> (pmol/l)	<b>4,332</b> (1,442-13,012)	<b>0,009</b>	<b>8,918</b> (1,472-51,787)	<b>0,017</b>
aGLP-1 30' (pmol/l)	1,13 (0,824-1,55)	0,448	1,075 (0,769-1,502)	0,674
$\Delta$ aGLP-1 (pmol/l)	0,815 (0,481-1,382)	0,448	0,764 (0,455-1,282)	0,308

\*prilagođen prema dobi, spolu i ITM. <sup>†</sup>uGLP-1-ukupni peptid 1 sličan glukagonu; <sup>‡</sup>aGLP-1- aktivni peptid 1 sličan glukagonu.

### 5.9.2. GLP-1 s obzirom na spol

Tablica 31. prikazuje razlike u koncentracijama GLP-1 s obzirom na spol. Uočena je statistički značajna razlika u koncentracijama uGLP-1 s obzirom na spol. Muškarci su imali više koncentracije uGLP-1 u 0' ( $z=-2,33$ ,  $P=0,02$ ), uGLP-1 30' ( $z=-3,705$ ,  $P<0,001$ ) te  $\Delta$  uGLP-1 ( $z=-2,512$ ,  $P=0,012$ ) u odnosu na žene. Nije nađena statistički značajna razlika u koncentracijama aGLP-1 s obzirom na

spol. U zdravih ispitanika nije nađena statistički značajna razlika u GLP-1 s obzirom na spol.

**Tablica 31. Koncentracije GLP-1 s obzirom na spol (N=30; Mann-Whitneyev test).**

<b>Varijabla</b>	<b>Muškarci (n=16)</b>	<b>Žene (n=14)</b>	<b>z</b>	<b>P</b>
<b>GLP-1*</b>				
<b>(pmol/l)</b>				
<b>Ukupni</b>				
<b>0'</b>	0,9 (0-6,4)	0,2 (0-0,7)	<b>-2,33</b>	<b>0,02</b>
<b>30'</b>	6,9 (1,6-29)	1,5 (0,5-11,6)	<b>-3,705</b>	<b>&lt;0,001</b>
<b>Δ 30'-0'<sup>†</sup></b>	5,44 (-1,9-24,3)	1,5 (0,3-11,4)	<b>-2,512</b>	<b>0,012</b>
<b>Aktivni</b>				
<b>0'</b>	0,2 (0,03-1,9)	0,2 (0-0,6)	-1,096	0,273
<b>30'</b>	1,5 (0,4-8)	1 (0,09-9,7)	-1,341	0,18
<b>Δ 30'-0'</b>	1 (-0,5-7,9)	0,9 (-0,31-9,3)	-0,608	0,543

\* GLP-1- peptid 1 sličan glukagonu, <sup>†</sup>Δ30'-0'- razlika između postprandijalne i bazalne koncentracije hormona.

Nije bilo statistički značajne razlike u univarijatnoj statistici s obzirom na spol u dobi, trajanju ŠBT1, postotku HbA1c, dozi ukupnog, bazalnog i bolus inzulina prema kilogramu TM, ITM, eGDR, eGFR prema CKD EPI, postojanju AH, MS, terapiji statinima te učestalosti nefropatije, retinopatije ili neuropatije. Muškarci su imali statistički značajno veći OS/OB nego žene (z=-2,952, P=0,03).

Tablica 32. prikazuje binarnu logističku regresiju za GLP-1 s obzirom na spol u ispitanika sa ŠBT1 (multivarijatna analiza). Binarna logistička regresija je učinjena u grubom modelu za uGLP-1 u 30' s obzirom na spol (s obzirom na muškarce). Prvi stupac, grubi model pokazuje statistički značajnu razliku, OR=1,594, CI 1,116-2,277. Drugi stupac, prilagođen prema OS/OB, trajanju ŠBT1 te dobi, pokazuje statistički značajnu razliku, OR=2,243, CI 1,087-4,627.

**Tablica 32. Binarna logistička regresija za GLP-1 s obzirom na spol u ispitanika sa ŠBT1.**

<b>Nezavisna varijabla</b>	<b>Grubi OR (95%CI)</b>	<b>P</b>	<b>Prilagođen (95% CI)*</b>	<b>OR</b>	<b>P</b>
uGLP-1 <sup>†</sup> 0'	7,614 (0,647-89,547)	0,106	8,517	(0,343-	0,191

(pmol/l)	211,688)			
<b>uGLP-1 30'</b>	<b>1,594</b> (1,116-2,277)	<b>0,01</b>	<b>2,243</b> (1,087-4,627)	<b>0,029</b>
<b>(pmol/l)</b>				
$\Delta$ uGLP-1	1,218 (0,952-1,558)	0,117	1,427 (0,938-2,173)	0,097
(pmol/l)				
aGLP-1 <sup>†</sup> 0'	8,854 (0,584-	0,116	8,86 (0,272-	0,22
(pmol/l)	134,328)		288,401)	
aGLP-1 30'	1,063 (0,751-1,505)	0,731	0,953 (0,608-1,491)	0,832
(pmol/l)				
$\Delta$ aGLP-1	0,986 (0,705-1,38)	0,936	0,891 (0,577-1,377)	0,604
(pmol/l)				

\*prilagođen prema dobi, trajanju bolesti te omjeru struka i bokova. <sup>†</sup>uGLP-1-ukupni peptid 1 sličan glukagonu; <sup>‡</sup>aGLP-1-aktivni peptid 1 sličan glukagonu.

## 5.10. Usporedba FGF-21 u plazmi u ispitanika sa ŠBT1 i u zdravih kontrolnih ispitanika

Tablica 33. prikazuje u ispitanika sa ŠBT1 i u zdravih kontrolnih ispitanika serumske koncentracije FGF-21 u 0', 30' i  $\Delta$ . Zbog jedne zdrave kontrolne ispitanice, koja je bila stršeća vrijednost u koncentraciji FGF-21 u 0' i u 30', za računanje razlika u vrijednosti FGF-21 između osoba sa ŠBT1 i zdravih kontrolnih ispitanika, bilo je uključeno 30 osoba sa ŠBT1 i 9 zdravih kontrola.

Medijan koncentracije FGF-21 u 0' u osoba sa ŠBT1 bio je 28,2 pg/ml (0-842,4), dok u zdravih kontrolnih ispitanika 104 pg/ml (7,7-240,7). Medijan koncentracije FGF-21 u 30' u osoba sa ŠBT1 bio je 28,25 pg/ml (0-946), u zdravih kontrolnih ispitanika 66 pg/ml (4,8-136,5). Medijan  $\Delta$  FGF-21 u osoba sa ŠBT1 bio je -1,1 pg/ml (-53,9-103,6), a u zdravih kontrolnih ispitanika -20,5 pg/ml (-104,2-0,7).

Neparametrijski Mann-Whitneyev test učinjen je radi ispitivanja razlika u koncentraciji navedenih hormona između osoba sa ŠBT1 i zdravih kontrolnih ispitanika. Statistički značajno manju bazalnu koncentraciju FGF-21 imale osobe sa ŠBT1 ( $z=-2,0$ ,  $P=0,046$ ) (Slika 35.). Nađena je statistički značajna razlika u  $\Delta$  FGF-21 ( $z=-2,767$ ,  $P=0,06$ ), gdje nije došlo do postprandijalnog pada

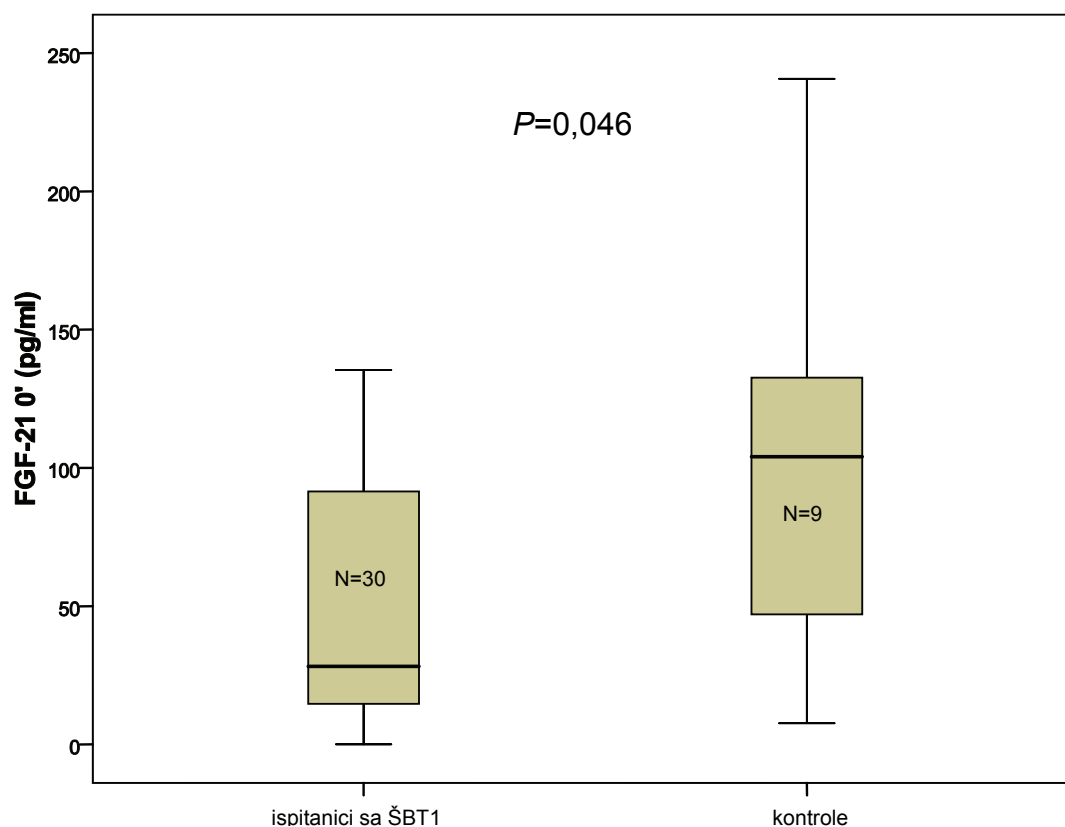
u koncentraciji FGF-21 30' u osoba sa ŠBT1, dok su zdravi kontrolni ispitanici imale statistički značajan pad koncentracije FGF-21 30'.

Wilcoxonovim testom ispitana je razlika između bazalnih i postprandijalnih vrijednosti hormona u osoba sa ŠBT1 (Tablica 33.). Između bazalnih i postprandijalnih vrijednosti FGF-21 ( $z=-0,032$ ,  $P=0,974$ ) nije nađena statistički značajna razlika. U zdravih kontrolnih ispitanika između bazalne i postprandijalne vrijednosti FGF-21 ( $z=-2,547$ ,  $P=0,011$ ) nađena je statistički značajna razlika (Slika 36.). Postprandijalna vrijednost FGF-21 bila je značajno niža od vrijednosti natašte.

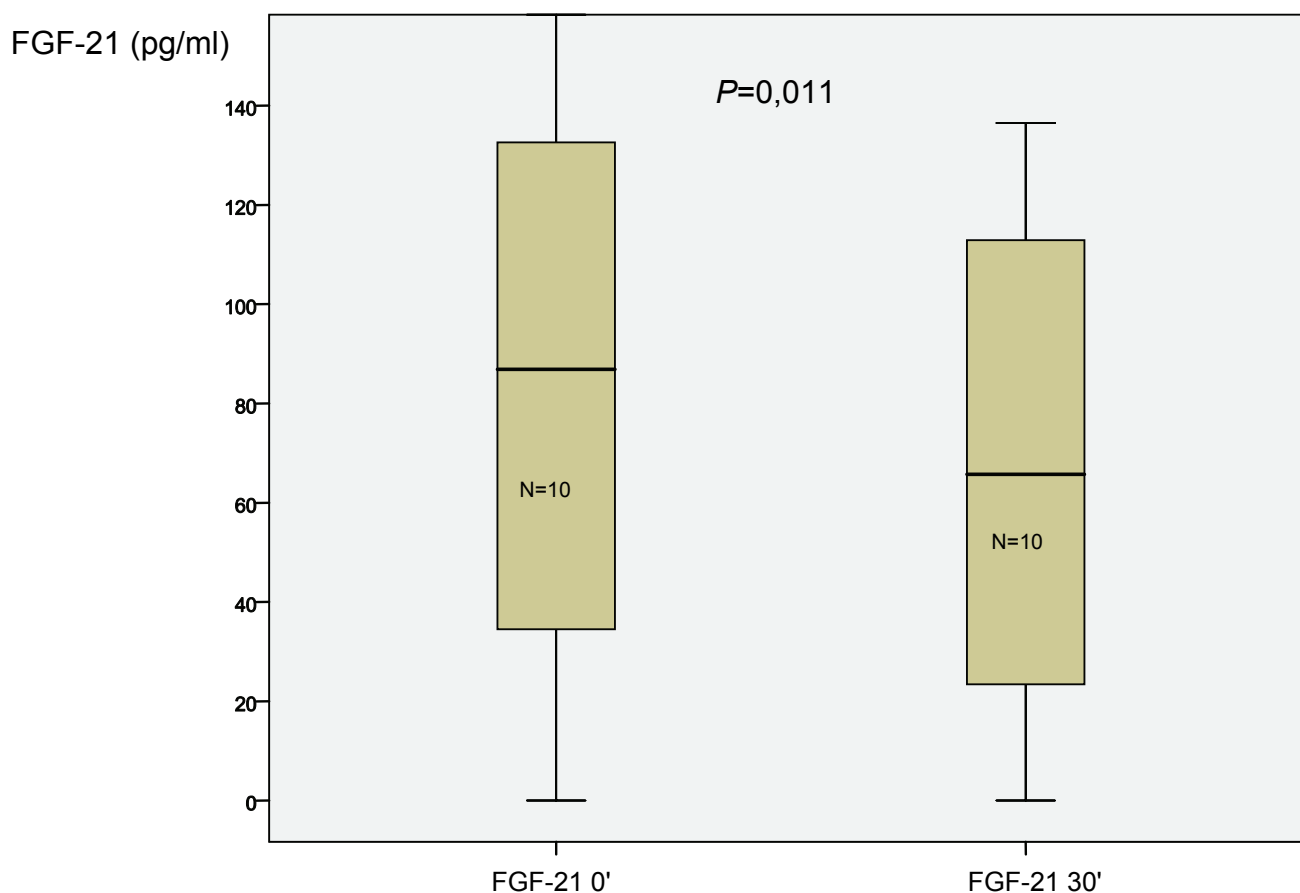
**Tablica 33. Razlike u plazmatskim koncentracijama FGF-21 između ispitanika sa šećernom bolešću tipa 1 (ŠBT1) i zdravih kontrolnih ispitanika (Mann-Whitneyev test) i razlike između bazalnih i postprandijalnih vrijednosti navedenih hormona (Wilcoxonov test).**

Varijabla	Ispitanici sa ŠBT1 (n=30)	Zdravi kontrolni ispitanici (n=9)	<i>z</i>	<i>P</i>
FGF-21* (pg/ml)				
0'	28,2 (0-842,4)	104 (7,7-240,7) <sup>‡</sup>	<b>-2</b>	<b>0,046</b>
30'	28,25 (0-946)	66 (4,8-136,5) <sup>‡</sup>	-1,233	0,217
$\Delta$ 30'-0' <sup>†</sup>	-1,1 (-53,9-103,6)	-20,5 (-104,2-0,7)	<b>-2,767</b>	<b>0,006</b>

\* FGF-21- čimbenik rasta fibroblasta-21, <sup>†</sup> $\Delta$ 30'-0'- razlika između postprandijalne i bazalne koncentracije hormona, <sup>‡</sup> $z=-2,547$ ,  $P=0,011$ .



Slika 35. Bazalna koncentracija čimbenika rasta fibroblasta-21 (FGF-21 0') u ispitanika sa šećernom bolesti tipa 1 (ŠBT1) i zdravih kontrolnih ispitanika (kontrole) (N=39; Mann-Whitneyev test).



Slika 36. Bazalna i postprandijalna koncentracija čimbenika rasta fibroblasta-21 (FGF-21 u 0' i 30') u zdravih kontrolnih ispitanika (N=10; Wilcoxonov test).

#### 5.10.1. FGF-21 u binarnoj logističkoj regresiji s obzirom na osnovnu skupinu ispitanika (ispitanici sa ŠBT1 i zdravi kontrolni ispitanici)

Tablica 34. prikazuje binarnu logističku regresiju FGF-21 s obzirom na osnovnu skupinu ispitanika (ispitanici sa ŠBT1 i zdravi kontrolni ispitanici).

Binarna logistička regresija je učinjena za  $\Delta$  FGF-21 s obzirom na zavisnu, dihotomnu varijablu skupina ispitanika (1=osobe sa ŠBT1, 2=zdravi kontrolni ispitanici). Grubi model pokazuje statistički značajnu razliku, OR=0,951, CI 0,908-0,997. Drugi stupac, nakon prilagodbe prema dobi, spolu i ITM, pokazuje statistički značajnu razliku. Koncentracija  $\Delta$  FGF-21 je ostala neovisno niža u zdravih kontrolnih ispitanika OR=0,944, CI 0,893-0,999.



**Tablica 34. Binarna logistička regresija FGF-21 s obzirom na osnovnu skupinu ispitanika (ispitanici sa ŠBT1 i zdravi kontrolni ispitanici).**

Nezavisna varijabla	Grubi OR (95%CI)	P	Prilagođen OR (95% CI)*	P
FGF-21 <sup>†</sup> 0' (pg/ml)	1,001 (0,996-1,006)	0,725	1 (0,995-1,005)	0,992
FGF-21 30' (pg/ml)	0,999 (0,994-1,005)	0,82	0,999 (0,993-1,004)	0,632
<b>Δ FGF-21 (pg/ml)</b>	<b>0,951 (0,908-0,997)</b>	<b>0,036</b>	<b>0,944 (0,893-0,999)</b>	<b>0,044</b>

\* prilagođen prema dobi, spolu i ITM. <sup>†</sup>FGF-21- čimbenik rasta fibroblasta-21.

### 5.10.2. FGF-21 s obzirom na spol

Tablica 35. prikazuje razlike u koncentracijama FGF-21 s obzirom na spol. Uočena je statistički značajna razlika u koncentraciji FGF-21 0' s obzirom na spol. Žene su imale statistički značajno višu koncentraciju FGF-21 0' ( $z=-2,03$ ,  $P=0,042$ ) u odnosu na muškarce. Koncentracija FGF-21 30' je bila viša u žena, no samo granično statistički značajna ( $z=-1,946$ ,  $P=0,052$ ). U zdravih ispitanika nije nađena statistički značajna razlika u FGF-21 s obzirom na spol.

**Tablica 35. Koncentracije FGF-21 s obzirom na spol (N=30; Mann-Whitneyev test).**

Varijabla	Muškarci (n=16)	Žene (n=14)	z	P
<b>FGF-21*</b>				
(pg/ml)				
<b>0'</b>	21,1 (0-124,8)	51,4 (13,1-842,4)	<b>-2,03</b>	<b>0,042</b>
30'	12,8 (0-167,1)	67,2 (7,3-946)	-1,946	0,052
<b>Δ 30'-0'<sup>†</sup></b>	<b>-0,9 (-31,2-60,5)</b>	<b>-4,5 (-53,9-103,6)</b>	<b>-0,021</b>	<b>0,983</b>

\* FGF-21- čimbenik rasta fibroblasta-21, <sup>†</sup>Δ30'-0'- razlika između postprandijalne i bazalne koncentracije hormona.

Tablica 36. prikazuje binarnu logističku regresiju za FGF-21 s obzirom na spol u ispitanika sa ŠBT1. U multivarijantnoj analizi nema statistički značajne razlike u

koncentraciji FGF-21 0' između muškaraca i žena nakon prilagodbe prema dobi, trajanju ŠB te OS/OB.

**Tablica 36. Binarna logistička regresija za FGF-21 s obzirom na spol u ispitanika sa ŠBT1.**

Nezavisna varijabla	Grubi OR (95%CI)	<i>P</i>	Prilagođen (95% CI)*	OR	<i>P</i>
FGF-21 <sup>†</sup> 0' (pg/ml)	0,99 (0,973-1,008)	0,271	0,981 (0,954-1,008)		0,16
FGF-21 30' (pg/ml)	0,994 (0,98-1,007)	0,359	0,981 (0,958-1,004)		0,105
$\Delta$ FGF-21 (pg/ml)	0,994 (0,969-1,019)	0,62	0,967 (0,932-1,003)		0,07

\*prilagođen prema dobi, trajanju bolesti te omjeru struka i bokova. <sup>†</sup>FGF-21- čimbenik rasta fibroblasta-21.

## 5.11. Ostalo

### 5.11.1. Povezanost GLP-1 i FGF-21 s regulacijom glikemije i s lipidemijom u zdravih kontrolnih ispitanika

U zdravih ispitanika (N=10) nađena je statistički značajna negativna povezanost između vrijednosti uGLP-1 0' s HbA1c ( $\rho=-0,84$ ,  $P=0,002$ ) te između uGLP-1 30' s HbA1c ( $\rho=-0,886$ ,  $P=0,001$ ). Također je nađena statistički značajna negativna povezanost između aGLP-1 u 30' s trigliceridima ( $\rho=-0,661$ ,  $P=0,038$ ).

### 5.11.2. Povezanost GLP-1 i FGF-21 s obilježjima bubrežne funkcije

Tablica 37. prikazuje povezanost koncentracija GLP-1 (uGLP-1 i aGLP-1) i FGF-21 s pojedinim obilježjima bubrežne funkcije. Statistički je nađena značajna pozitivna povezanost između vrijednosti uGLP-1 u 30' s kreatininemijom ( $\rho=0,674$ ,  $P<0,001$ ) te značajna negativna povezanost između vrijednosti FGF-21 u 30' s kreatininemijom ( $\rho=-0,392$ ,  $P=0,032$ ). Također postoji negativna povezanost između vrijednosti FGF-21 0' s kreatininemijom, iako

nedovoljno statistički značajna. Linearna regresija je pokazala statistički značajnu neovisnu povezanost između uGLP-1 30' s kreatininom,  $P=0,011$ ,  $R^2=0,209$  (uGLP-1 30'=2,722-1,624\*kreatinin).

**Tablica 37. Povezanost peptida 1 sličnog glukagonu (GLP-1) i čimbenika rasta fibroblasta-21 (FGF-21) s obilježjima bubrežne funkcije u ispitanika sa šećernom bolesti tipa 1 (ŠBT1); N=30; Spearmanov test. Vrijednosti u 0' su natašte, a u 30' su postprandijalne.**

<b>Varijable u korelaciji</b>	<b>Koeficijent korelacije (p)</b>	<b>P</b>
uGLP-1* 0'		
kreatininemija	0,156	0,411
CKD EPI <sup>†</sup>	0,309	0,096
albuminurija	0,192	0,31
uGLP-1 30'		
kreatininemija	<b>0,674</b>	<b>&lt;0,001</b>
CKD EPI	-0,235	0,211
albuminurija	-0,14	0,46
aGLP-1 <sup>‡</sup> 0'		
kreatininemija	-0,068	0,721
CKD EPI	0,095	0,616
albuminurija	0,048	0,8
aGLP-1 30'		
kreatininemija	0,183	0,334
CKD EPI	0,197	0,296
albuminurija	0,191	0,311
FGF-21 <sup>§</sup> 0'		
kreatininemija	-0,344	0,063
CKD EPI	-0,018	0,926
albuminurija	-0,038	0,842
FGF-21 30'		
kreatininemija	<b>-0,392</b>	<b>0,032</b>
CKD EPI	-0,025	0,897
albuminurija	0,003	0,986

\* uGLP-1- ukupni peptid 1 sličan glukagonu, <sup>†</sup> CKD EPI- eng. *Chronic Kidney Disease Epidemiology* formula, <sup>‡</sup> aGLP-1- aktivni peptid 1 sličan glukagonu, <sup>§</sup> FGF-21- čimbenik rasta fibroblasta-21.

Tablica 38. prikazuje odnos zavisne varijable uGLP-1 30' i kreatinina u serumu u multiploj linearnoj regresiji standardiziranoj za ITM. Koncentracija uGLP-1 30' neovisno o ITM statistički značajno pozitivno korelira s kreatininom u serumu (multivarijatna analiza).

**Tablica 38. Multipla linearna regresija standardizirana za ITM<sup>†</sup>, odnosa zavisne varijable uGLP-1 30'<sup>\*</sup> i kreatinina.**

Varijabla	Koeficijent beta	P
kreatinin	0,4	0,032
ITM	0,183	0,31

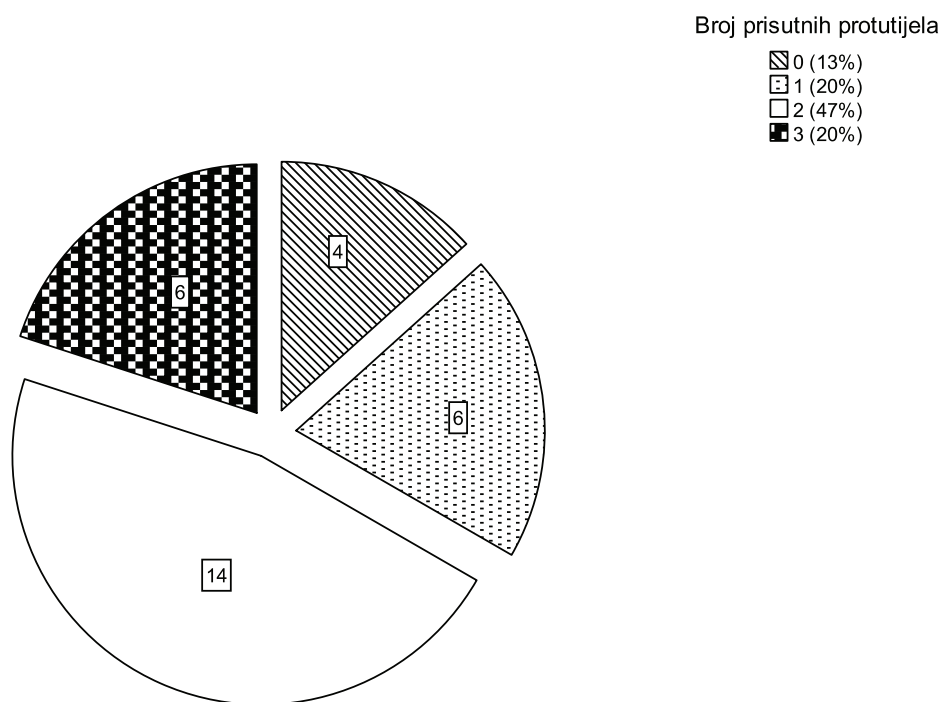
<sup>\*</sup> zavisna varijabla: uGLP-1 30'. <sup>†</sup> ITM- indeks tjelesne mase.

### 5.11.3. Koncentracije GLP-1, FGF-21 i glukagona s kalorijskom vrijednosti doručka u ispitanika sa ŠBT1

Nije nađena statistički značajna razlika u koncentracijama GLP-1 i FGF-21 između skupina ispitanika sa ŠBT1 podijeljenih prema vrijednostima za doručak unesenih kalorija (4 skupine: skupina 1= 324 kcal, skupina 2= 396 kcal, skupina 3= 433 kcal, skupina 4= 598 kcal). Nađena je statistički značajna razlika u postprandijalnoj koncentraciji glukagona s obzirom na vrijednost unesenih kalorija za doručak ( $\chi^2=9,736$ ,  $P=0,021$ , Kruskal-Wallisov test). *Post hoc* Mann-Whitneyevim testom nađena je razlika u koncentraciji glukagona 30' između skupine 1 i 4 (93,85 pg/ml, od 64,6 do 1016 vs 63,3 pg/ml, od 60,8 do 66,2;  $z=-2,52$ ,  $P=0,012$ ), skupine 2 i 4 (77,7 pg/ml, od 72,5 do 97,1 vs 63,3 pg/ml, od 60,8 do 66,2;  $z=-2,393$ ,  $P=0,017$ ) te skupine 3 i 4 (90,85 pg/ml, od 80,6 do 223,9 vs 63,3 pg/ml, od 60,8 do 66,2;  $z=-2,324$ ,  $P=0,02$ ). Ispitanici s najmanjim kalorijskim unosom (skupina 1) imali su višu postprandijalnu koncentraciju glukagona nego ispitanici najvećeg kalorijskog unosa (skupina 4).

#### 5.11.4. Odnos koncentracija GLP-1 i FGF-21 s protutijelima na gušteraču u ispitanika sa ŠBT1

Prema broju vrsta pozitivnih protutijela na otočiće gušterače, osobe smo razvrstali prema onima koji su imali 0 pozitivnih protutijela (13%), 1 protutijelo pozitivno (20%), 2 pozitivna protutijela (47%) te sva 3 pozitivna protutijela (20%) (Slika 37.).



Slika 37. Broj pozitivnih protutijela na gušteraču u ispitanika sa šećernom bolesti tipa 1 (N=30). Brojevi unutar dijelova pite prikazuju broj ispitanika.

Nije nađena statistički značajna razlika GLP-1 ni FGF-21 između skupina ispitanika prema ukupnom broju vrsta pozitivnih protutijela.

Nađena je statistički značajna razlika u dobi između skupina prema broju pozitivnih vrsta protutijela ( $\chi^2=9,341$ ,  $P=0,025$ , Kruskal-Wallisov test). Prema *post hoc* Mann-Whitneyevom testu osobe koje su imale sva 3 pozitivna protutijela su bile mlađe dobi od osoba s 2 pozitivna protutijela (26 godina, od 20 do 50 vs 42 godine, od 26 do 59;  $z=-2,518$ ,  $P=0,012$ ).

#### 5.11.5. Povezanost GLP-1 i FGF-21 s dobi, trajanjem ŠBT1, ITM, OS i krvnim tlakom u ispitanika sa ŠBT1

Tablica 39. prikazuje povezanost plazmatskih koncentracija GLP-1 (uGLP-1 i aGLP-1) i FGF-21 s dobi, trajanjem ŠBT1, ITM, OS, OS/OB i sistoličkim i dijastoličkim krvnim tlakom u ispitanika sa ŠBT1. Aktivni GLP-1 u 30' je bio statistički značajno niže koncentracije, što je ŠBT1 dulje trajala ( $\rho=-0,364$ ,  $P=0,048$ ). Nije uočeno drugih statistički značajnih korelacija.

**Tablica 39. Povezanost koncentracija peptida 1 sličnog glukagonu i čimbenika rasta fibroblasta-21 u plazmi s dobi, trajanjem šećerne bolesti, indeksom tjelesne mase, opsegom struka i krvnim tlakom (Spearmanov test; N=30).**

Varijable u korelaciji	Koeficijent korelacije ( $\rho$ )	P
<b>uGLP-1* 0'</b>		
Dob	-0,277	0,139
Trajanje bolesti	-0,252	0,179
ITM†	0,178	0,348
OS‡	0,264	0,158
OS/OB§	0,165	0,383
sistolički krvni tlak	0,158	0,405
dijastolički krvni tlak	0,158	0,406
<b>uGLP-1 30'</b>		
Dob	0,117	0,54
Trajanje bolesti	-0,057	0,765
ITM	0,325	0,08
OS	0,328	0,077
OS/OB	0,243	0,195
sistolički krvni tlak	0,186	0,324
dijastolički krvni tlak	0,214	0,257
<b>aGLP-1   0'</b>		
Dob	-0,031	0,872
Trajanje bolesti	-0,032	0,865
ITM	-0,088	0,644
OS	0,138	0,467
OS/OB	0,201	0,287
sistolički krvni tlak	-0,079	0,677
dijastolički krvni tlak	-0,255	0,174
<b>aGLP-1 30'</b>		

Dob	-0,17	0,369
<b>Trajanje bolesti</b>	<b>-0,364</b>	<b>0,048</b>
ITM	0,134	0,481
OS	-0,007	0,97
OS/OB	-0,109	0,565
sistolički krvni tlak	0,161	0,396
dijastolički krvni tlak	0,002	0,99
FGF-21 <sup>¶</sup> 0'		
Dob	0,153	0,42
Trajanje bolesti	-0,101	0,597
ITM	0,05	0,793
OS	0,071	0,708
OS/OB	0,022	0,907
sistolički krvni tlak	-0,051	0,789
dijastolički krvni tlak	-0,108	0,57
FGF-21 30'		
Dob	0,211	0,264
Trajanje bolesti	0,104	0,585
ITM	-0,119	0,531
OS	0,074	0,699
OS/OB	0,104	0,584
sistolički krvni tlak	0,088	0,644
dijastolički krvni tlak	0,026	0,891

<sup>\*</sup>uGLP-1- ukupni peptid 1 sličan glukagonu, <sup>†</sup> ITM- indeks tjelesne mase, <sup>‡</sup>OS- opseg struka, <sup>§</sup>OS/OB- omjer opsega struka i bokova, <sup>||</sup> aGLP-1- aktivni peptid 1 sličan glukagonu, <sup>¶</sup>FGF-21- čimbenik rasta fibroblasta-21.

Kada podijelimo ispitanike u dvije skupine prema medijanu trajanja ŠBT1 (21 godina) nađena je statistički značajna razlika u koncentraciji aGLP-1 30' ( $z=-1,973$ ,  $P=0,048$ ). Osobe koje su imale kraće trajanje ŠBT1 imale su veću koncentraciju aGLP-1 u 30' (1,6 pmo/l, od 0,4 do 9,7 vs 1 pmol/l, od 0,09 do 4,8). Nije uočena statistički značajna razlika u drugim koncentracijama ispitivanih hormona između ove dvije skupine.

## **6. RASPRAVA**

### **6.1. Povezanost GLP-1 s regulacijom glikemije, lipidemijom i mikrovaskularnim komplikacijama u ispitanika sa ŠBT1**

#### **6.1.1. GLP-1 u plazmi i regulacija glikemije**

Nađena je negativna povezanost između bazalnog i postprandijalnog uGLP-1 s GUP 0' što je sukladno postavljenoj hipotezi istraživanja, a i pozitivnom terapijskom učinku GLP-1 analoga na regulaciju glikemije opisanoga u dosadašnjim istraživanjima u osoba sa ŠBT1 (147, 161-164). Bazalni uGLP-1 je neovisno o dobi, ITM i trajanju ŠBT1 negativno korelirao s GUP 0'. Žene s odličnom regulacijom glikemije imale su veći bazalni aGLP-1, dok je u muškaraca situacija bila obrnuta. Zašto postoji oprečna razlika u koncentraciji aGLP-1 s obzirom na spol nije logički objašnjivo. Nije bilo razlike u trajanju ŠBT1, regulaciji glikemije niti dozi dnevnog inzulina s obzirom na spol, koji bi možda mogao objasniti navedenu razliku. Kronična hiperglikemija dovodi do neosjetljivosti L-stanica tankog crijeva, te bi prema tome osobe s boljom regulacijom glikemije trebale imati veću endogenu koncentraciju GLP-1, kao što je i pokazano u žena. U zdravih kontrolnih ispitanika nađena je negativna povezanost između bazalnog i postprandijalnog uGLP-1 s regulacijom glikemije, što je potvrđuje dosadašnje spoznaje.

Prema Callanovom istraživanju (metaanaliza kliničkih istraživanja i sustavni pregled), u osoba sa ŠBT2 nađena je negativna povezanost između postprandijalne koncentracije GLP-1 s regulacijom glikemije (118). Opisano je da dodatak liraglutida inzulinskoj terapiji u pretilih osoba sa ŠBT1 nakon 180 dana liječenja dovodi do značajnog poboljšanja regulacije glikemije, smanjenja vrijednosti HbA1c, smanjenja potrebe za dozom inzulina te do smanjenja vrijednosti sistoličkog krvnog tlaka i gubitka na TM (163). Također je slično pokazano u jednoj drugoj studiji u osoba sa ŠBT1, gdje dodatak liraglutida inzulinskoj terapiji u razdoblju od 24 tjedana dovodi do poboljšanja regulacije glikemije, smanjenja potrebe za dozom inzulina te do gubitka na TM (263). Teško je ipak procijeniti i usporediti farmakološko djelovanje endogenog GLP-1 s liraglutidom, odnosno s GLP-1 analogom.



Nekoliko je istraživanja do sada pokazalo pozitivan terapijski učinak inkretinskih hormona na regulaciju glikemije (163, 263). Postoje, međutim, i istraživanja koja su opisala neutralan učinak inkretinskih hormona na regulaciju glikemije u osoba sa ŠBT1 (165). Svakako se ne može povući paralela između endogene koncentracije GLP-1 i GLP-1 analoga, jer endogeni GLP-1 podliježe prebrzoj razgradnji DPP-IV enzimu. Za sada, ovi rezultati postavljaju preliminarne temelje mogućoj farmakološkoj terapiji bolesnika sa ŠBT1 zasnovanoj na GLP-1, ali je vjerojatno među njima određena ciljna podskupina čiji profil još treba prepoznati u nekim budućim istraživanjima.

#### **6.1.2. GLP-1 u plazmi i vrijednosti lipida**

Nađena je negativna povezanost između postprandijalnih koncentracija uGLP-1 i aGLP-1 s vrijednostima ukupnog kolesterola, HDL i LDL kolesterola. Postprandijalni uGLP-1 je neovisno o dobi, trajanju ŠBT1 i uzimanju statina negativno korelirao s ukupnim kolesterolom. Takva oprečna povezanost endogenih koncentracija GLP-1 s lipidemijom, u smislu korisnih i štetnih lipida, nije uzročno povezana, već su uz nižu koncentraciju ukupnog kolesterola manje koncentracije i njegovih sastavnica, a to su svakako i HDL i LDL kolesterol. Vjerojatno zato osobe i s nižim ukupnim kolesterolom, nižim LDL i nižim HDL kolesterolom imaju veću koncentraciju GLP-1. Nije nađena povezanost GLP-1 s trigliceridima u osoba sa ŠBT1, no naši ispitanici su imali gotovo uredne koncentracije triglicerida.

U istraživanju Japanaca u osoba s MS, ali bez ŠBT1, opisana je negativna korelacija GLP-1 s HDL kolesterolom, a pozitivna s trigliceridima, opisivajući to kontraregulacijskim mehanizmom da se nadvlada postojeća IR u tih bolesnika (134). Također je u jednom drugom istraživanju u osoba bez ŠB koje su podvrgnute koronarografiji opisana pozitivna korelacija GLP-1 s obilježjima ateroskleroze, odnosno s trigliceridima i LDL kolesterolom (136), što je bilo iznenađujuće, vodeći se činjenicom da primjena GLP-1 analoga u eksperimentalnim modelima i kliničkim studijama ima zaštitni učinak na srce. Prospektivne studije možda bi bolje razjasnile ovakav nalaz. Dokazano je u

randomiziranim kliničkim studijama da terapija inkretinskim hormonima djeluje povoljno na lipidemiju i da smanjuje srčanožilni rizik u osoba sa ŠBT2 (264-266). Slični pozitivni terapijski učinci inkretinskih hormona mogli bi se očekivati i u osoba sa ŠBT1. Naravno, potrebne su prospektivne kliničke studije s većim uzorkom koje će ispitati učinak GLP-1 analoga na lipidemiju u osoba sa ŠBT1. U zdravih kontrolnih ispitanika nađena je negativna, relativno čvrsta povezanost postprandijalne koncentracije aGLP-1 s trigliceridima, na temelju čega možemo pretpostaviti da je endogena koncentracija aGLP-1 u zdravih ljudi odraz prave metaboličke aktivnosti GLP-1 na lipidemiju te da u zdravih osoba ne postoji GLP-1 rezistencija. Dokazano je već da infuzija GLP-1 smanjuje apsorpciju triglicerida u zdravih ljudi (267).

### **6.1.3. GLP-1 u plazmi i mikrovaskularne komplikacije**

Endogene koncentracije GLP-1 u prikazanih ispitanika sa ŠBT1 nisu se razlikovale s obzirom na prevalenciju dijabetičke nefropatije i dijabetičke retinopatije. Najviše je ispitanika sa ŠBT1 imalo kao mikrovaskularnu komplikaciju dijabetičku neuropatiju. Viša koncentracija bazalnog aGLP-1 je bila povezana s nižom prevalencijom dijabetičke neuropatije, iako granično statistički značajno. Nađena je razlika u koncentracijama GLP-1 s obzirom na podvrstu dijabetičke neuropatije. Osobe koje su imale simetričnu neuropatiju su imale niži medijan bazalnog aGLP-1 u usporedbi s ispitanicima koji nisu imale neuropatiju, a osobe koje su pripadale kvartili s najnižom koncentracijom bazalnog aGLP-1 imale su najveću učestalost dijabetičke neuropatije. U dosadašnjim je istraživanjima u eksperimentalnim modelima opisan neuroprotektivni učinak inkretinskih analoga, odnosno GLP-1 analoga (108). Također je opisan pozitivan učinak GLP-1 na smanjenje progresije dijabetičke neuropatije u miševa sa ŠBT1 (140, 172). Plejotropni učinci GLP-1 i prisustvo GLP-1R na raznim organima su neosporni (167), međutim, još se uvijek nedovoljno zna koliko inkretini smanjuju progresiju mikrovaskularnih komplikacija u osoba sa ŠB. Zaštitnim učinkom GLP-1 analoga na ekstremne varijacije u glikemiji smanjuje se endotelna disfunkcija, oksidativni stres i upala

u organizmu (176). Rezultati ovog istraživanja podržavaju dosadašnje spoznaje, ali i otvaraju mogućnost specifičnijeg utjecaja GLP-1 u smjeru razvoja određenijeg tipa neuropatskog poremećaja.

U eksperimentalnim životinjskim modelima opisani su mogući protektivni učinci GLP-1 analoga na razvoj dijabetičke retinopatije (173, 174) te na smanjenje albuminurije i to neovisno o učinku na glikemiju (166-170). Opisuju se protektivni učinci GLP-1 analoga na razvoj dijabetičke nefropatije (268, 269). Moguće je da endogena koncentracija GLP-1 u osoba sa ŠBT1 nije dovoljno visoka da pokazuje povezanost s mikrovaskularnim komplikacijama u prikazanom istraživanju.

U prikazanom istraživanju postprandijalni uGLP-1 značajno pozitivno korelira s kreatininom. Naši su ispitanici imali gotovo urednu bubrežnu funkciju. Opisano je da je u osoba s KBB koncentracija GLP-1 povišena (103) jer se izlučuje bubrezima, što može objasniti pozitivnu korelaciju GLP-1 s kreatininom u serumu. U životinjskim modelima je opisano da primjena GLP-1 analoga smanjuje albuminuriju neovisno o učinku na glikemiju (166-170). U ovom istraživanju u osoba sa ŠBT1 nije nađena korelacija GLP-1 s albuminurijom. Nismo našli povezanost između koncentracija GLP-1 s kreatininom u zdravih kontrolnih ispitanika.

## **6.2. Povezanost FGF-21 s regulacijom glikemije, lipidemijom i mikrovaskularnim komplikacijama u ispitanika sa ŠBT1**

### **6.2.1. FGF-21 u serumu i regulacija glikemije**

Nađena je, neovisno o dobi, pozitivna povezanost između bazalnog FGF-21 s HbA1c, odnosno niža koncentracija FGF-21 je bila povezana s boljom regulacijom glikemije, što potvrđuje postavljenu hipotezu istraživanja. Sukladno tome su muškarci s boljom regulacijom glikemije imali nižu koncentraciju bazalnog FGF-21. Ovakva povezanost odgovara činjenici da kronična hiperglikemija (metabolička kriza) potiče lučenje FGF-21 (190).

Do sada, koliko je poznato prema pregledu objavljenih izvješća, nije opisivana povezanost koncentracije FGF-21 s regulacijom glikemije u osoba sa ŠBT1 te će biti potrebna daljnja istraživanja da potvrde ili ospore naše rezultate.

### **6.2.2. FGF-21 u serumu i vrijednosti lipida**

Koncentracija FGF-21 u prikazanom istraživanju nije pokazala jasnu povezanost s lipidemijom. Jedino je nađena pozitivna povezanost između bazalne koncentracije FGF-21 s HDL3 kolesterolom te između postprandijalne koncentracije FGF-21 s HDL i HDL3 kolesterolom.

U osoba sa ŠBT1 do sada nije opisivana povezanost FGF-21 s obilježjima lipidemije. Međutim, u osoba sa ŠBT2 i/ili IR u dosadašnjim je istraživanjima opisana djelomično oprečna povezanost FGF-21 s obilježjima lipidemije. U jednom istraživanju se opisuje pozitivna korelacija FGF-21 s dislipidemijom (209, 217), a u drugom istraživanju pak pozitivna korelacija FGF-21 s HDL kolesterolom (201). U osoba sa SŽB uočene su povišene koncentracije FGF-21, što objašnjavaju kompenzacijskim povišenjem FGF-21 ili „rezistencijom na FGF-21“ (227). Postoje i istraživanja u kojima nije uopće nađena povezanost FGF-21 s lipidemijom (202, 204). U eksperimentalnim životinjskim modelima je dokazano da FGF-21 posjeduje antihiperglikemijske i antihiperlipemične učinke (229, 230), no neki se učinci ipak razlikuju između životinja i ljudi, odnosno ne znaju se još svi učinci FGF-21 u ljudi. Potrebne su također kliničke studije koje će ispitati učinak FGF-21 na lipidemiju u osoba sa ŠBT1 u nepresječnom modelu.

U zdravih kontrolnih ispitanika također nije nađena povezanost FGF-21 s parametrima lipidemije te su definitivno potrebna daljnja istraživanja.

### **6.2.3. FGF-21 u serumu i mikrovaskularne komplikacije**

Nije nađena razlika u koncentraciji FGF-21 s obzirom na prisutnost mikrovaskularnih komplikacija. Unutar skupine s većom vrijednosti eGDR (veća IO) uočena je razlika u vrijednosti postprandijalnog FGF-21 između osoba s različitim stupnjem dijabetičke polineuropatije. Skupina ispitanika s drugim

stupnjem dijabetičke polineuropatije je imala veću koncentraciju postprandijalnog FGF-21 od skupine ispitanika s početnim ili prvim stupnjem polineuropatije u skupini ispitanika s većom IO. U skupini osoba s većom IR nije nađena razlika u koncentraciji FGF-21 s obzirom na stupanj dijabetičke polineuropatije.

FGF-21 je do sada opisan prvenstveno kao hormon koji pojačava IO (208), moguće je da je to razlog zašto smo našli povišenu koncentraciju FGF-21 samo u onih osoba s većom IO i dijabetičkom polineuropatijom. Do sada su, suprotno ovomu, u osoba sa ŠBT2 i IR nađene paradoksalno povećane koncentracije FGF-21 (186, 201, 209-212). Liječenjem IR, odnosno poboljšanjem IO dolazi do pada koncentracije FGF-21 (232-234). Možda je u osoba sa ŠBT1 oprečna situacija glede endogene koncentracije FGF-21 i IO, te možda ne postoji rezistencija na FGF-21 kao u osoba sa ŠBT2. Povezanost endogenih koncentracija FGF-21 s mikrovaskularnim komplikacijama u ŠBT1 nije do sada opisivana, pa prikazane rezultate ne možemo usporediti s drugim istraživanjima. U osoba sa ŠBT2 postoje oprečni rezultati glede koncentracije FGF-21 i mikrovaskularnih komplikacija. U pojedinim izvješćima je povišena koncentracija FGF-21 u osoba s kroničnim komplikacijama (201), a postoje i publikacije u kojima se ne opisuje povezanost FGF-21 s mikrovaskularnim komplikacijama (236).

U prikazanom istraživanju koncentracija FGF-21 korelira negativno s kreatininom u serumu. Opisano je da FGF-21 neovisno pozitivno korelira s albuminurijom u osoba sa ŠBT2 (201), no u našem istraživanju nije nađena ovakva korelacija. Opisano je također da je koncentracija FGF-21 povišena u bolesnika s KBB te se proporcionalno povećava s pogoršanjem bubrežne funkcije (244-247). Dosadašnja istraživanja su rađena ili na zdravim ispitanicima ili u osoba sa ŠBT2. Nije ispitivana povezanost FGF-21 s kreatininom u osoba sa ŠBT1, a dosadašnji rezultati u osoba sa ŠBT2 su oprečni našima, premda su naši ispitanici imali gotovo urednu bubrežnu funkciju. Nismo našli povezanost između koncentracija FGF-21 s kreatininom u zdravih kontrolnih ispitanika.

### **6.3. Međudnos koncentracija GLP-1 i FGF-21 u plazmi u ispitanika sa ŠBT1 i u zdravih kontrolnih ispitanika**

Nije nađena povezanost koncentracija GLP-1 s FGF-21 niti u osoba sa ŠBT1 niti u zdravih kontrolnih ispitanika. Nakon podjele s obzirom na spol, nađena je u muškaraca sa ŠBT1 pozitivna povezanost bazalnog uGLP-1 s vrijednostima FGF-21. U žena sa ŠBT1 nije nađena takva povezanost, a niti u zdravih kontrolnih ispitanika. U osoba s manjim eGDR također je nađena pozitivna povezanost bazalnog uGLP-1 s postprandijalnom koncentracijom FGF-21 u osoba sa ŠBT1. U dosadašnjim istraživanjima nije gledana povezanost endogenih koncentracija GLP-1 s FGF-21 u čistom modelu, a niti s obzirom na spol te eGDR, tako da je svaki rezultat vrijedan pažnje. Zašto je ta povezanost značajna samo u muškaraca nije jasno, možda zato što su muškarci imali općenito veću koncentraciju bazalnog uGLP-1 u odnosu na žene. Povezanost GLP-1 s FGF-21 u osoba s manjim eGDR, odnosno većom IR, upućuje da je vjerojatno IR poveznica između ova 2 hormona. Ono što se za sada zna u eksperimentalnim modelima je da primjena GLP-1 agonista liraglutida povećava aktivnost FGF-21 te na taj način IO (238). Povezanost endogenih koncentracija GLP-1 s FGF-21 će se morati istražiti i u nekoj drugoj populaciji, a ne samo u osoba sa ŠBT1. U našoj zdravoj kontrolnoj skupini nije bilo povezanosti između GLP-1 s FGF-21, niti s obzirom na spol. Svakako možemo opisati samo povezanost ova dva hormona, a nikako uzročnu vezu, na temelju prikazanog istraživanja.

### **6.4. Povezanost koncentracija GLP-1 s inzulinskom rezistencijom (eGDR), MS, koncentracijom glukagona u plazmi te inzulinom u ispitanika sa ŠBT1**

Nije nađena povezanost GLP-1 s eGDR, odnosno IR u osoba sa ŠBT1. Nađena je povezanost između koncentracije uGLP-1 s prisutnosti MS u osoba sa ŠBT1 definiranog prema NCEP:ATP III kriterijima. Osobe koje imaju MS su imale veće koncentracije postprandijalnog uGLP-1 te  $\Delta$  uGLP-1. Gledajući navedene koncentracije hormona s obzirom na broj prisutnih kriterija MS nađena je veća

koncentracija postprandijalnog uGLP-1 i  $\Delta$  uGLP-1 u osoba koje su imale tri kriterija MS u odnosu na osobe s jednim prisutnim kriterijem MS. Znamo da terapija IA poboljšava IR i ostale parametre MS (110, 130-133), ali se do nedavno nije ništa znalo o endogenim koncentracijama GLP-1 u osoba sa MS. Japanci su opisali povišenu endogenu koncentraciju GLP-1 u osoba sa MS, neovisno o prisustvu ŠB (134). Pretpostavljaju da bi povišena koncentracija GLP-1 u njih mogla biti predskazatelj ateroskleroze te nagoviještaju prisustvo „GLP-1 rezistencije“ u osoba sa MS. Spominje se da bi kalorijska vrijednost obroka u njihovom istraživanju bila moguć uzrok povišenoj koncentraciji GLP-1 u osoba sa MS (135). Na temelju prikazanih rezultata možemo pretpostaviti da u naših osoba sa ŠBT1 također postoji rezistencija na GLP-1. U našem istraživanju nije bilo razlike u kalorijskoj vrijednosti obroka s obzirom na postojanje MS. Osobe koje su imale MS imale su veću učestalost dijabetičke retinopatije u prikazanom istraživanju, međutim, nije nađena razlika u učestalosti dijabetičke nefropatije i neuropatije. Također su osobe sa MS i ŠBT1 bile starije dobi, duljeg trajanja ŠBT1 i smanjene bubrežne funkcije, iako još uvijek relativno očuvane u odnosu na one bez MS. Nije nađena razlika u glikemiji, lipidemiji niti potrebi za inzulinom s obzirom na postojanje MS u osoba sa ŠBT1 u prikazanom istraživanju. Koncentracija GLP-1 je međutim ostala u osoba s MS i ŠBT1, ali samo u univarijantnoj analizi.

Nije nađena povezanost GLP-1 s koncentracijom glukagona. Svakako terapijski učinak GLP-1 analoga koji djeluje suprimirajući glukagon može ukazati na to da su ove prikazane endogene koncentracije GLP-1 toliko niske da nisu u stanju bez dodatne pomoći izvana djelovati na koncentraciju glukagona.

U čistome modelu nije nađena povezanost koncentracija GLP-1 s ukupnom dnevnom dozom inzulina, bolus i/ili bazalnim inzulinom. U ovom istraživanju opisana je povezanost GLP-1 s inzulinom u osoba s povišenom IR, što može biti predskazatelj da je povezanost između GLP-1 i inzulina nađena u onih osoba koje trebaju više inzulina za jednak učinak na glikemiju. Budući da su

naši ispitanici bili C-peptid negativni, proučavali smo povezanost samo egzogenog inzulina s hormonima.

### **6.5. Povezanost koncentracija FGF-21 s inzulinskom rezistencijom (eGDR), MS, koncentracijom glukagona u plazmi te inzulinom u ispitanika sa ŠBT1**

Nađena je povezanost između bazalne koncentracije FGF-21 s vrijednosti eGDR. Naime osobe koje su pripadale skupini s većom koncentracijom FGF-21 su imale veći eGDR, odnosno veću IO. To potvrđuje već ranije navedenu činjenicu da je izgleda IO u osoba sa ŠBT1 ta koja pogoduje većoj endogenoj koncentraciji FGF-21. Rezultati u osoba sa ŠBT2 te u osoba s IR bez ŠBT2 pokazali su do sada oprečne rezultate. U osoba sa ŠBT2 i IR te u osoba s IR, a bez ŠBT2 koncentracija FGF-21 je paradoksalno povećana, što pripisuju kompenzacijskim mehanizmom da bi povećana koncentracija FGF-21 mogla nadvladati postojeću IR (213, 214), odnosno djelovati protiv glukotoksičnosti ili lipotoksičnosti. Opisuje se također i moguća rezistencija na FGF-21 u tih osoba (215, 216). Bez obzira na dosadašnje pretpostavke, još uvijek nije do kraja razjašnjeno zašto je u tih osoba povećana koncentracija FGF-21. U naših ispitanika sa ŠBT1 drukčija je situacija, ne možemo ju usporediti s drugim ispitanicima sa ŠBT1 jer nije do sada istražena, ali možemo reći da je oprečna dosadašnjim saznanjima o FGF-21 i IR. Moguće je da patofiziologija ŠBT1 igra ulogu u tome.

Postprandijalna koncentracija FGF-21 je pozitivno korelirala s bazalnom vrijednosti glukagona. Do sada je jedno istraživanje opisalo da primjena glukagona u zdravih i osoba sa ŠBT1 povisuje koncentraciju FGF-21 (243).

U čistome modelu nije nađena povezanost koncentracija FGF-21 s ukupnom dnevnom dozom inzulina, bolus i/ili bazalnim inzulinom. U niti jednom modelu nije nađena povezanost FGF-21 s inzulinom u naših osoba sa ŠBT1. Dosadašnja istraživanja s pokazala dvojbene rezultate između inzulina s FGF-21. Neka istraživanja opisuju da umjetno izazvana hiperinzulinemija u zdravih



ljudi dovodi do porasta koncentracije FGF-21 (241), dok drugi opisuju povišenje koncentracije FGF-21 kod osoba sa ŠBT1 bez terapije inzulinom što se objašnjava povišenom koncentracijom SMK u slučajevima potpunog manjka inzulina (241, 242). Postavlja se pitanje suprimira li inzulin u mršavih ljudi lučenje FGF-21 te postoji li razlika između djelovanja endogenog i egzogenog inzulina na koncentraciju FGF-21. Za sada se zna da odgovor FGF-21 na inzulin ovisi o nekoliko čimbenika: debljina, koncentracija SMK, koncentracija inzulina i IR (188).

## **6.6. Analiza GLP-1 i FGF-21 s obzirom na prisutnost MS prema eGDR**

U ovom istraživanju na temelju NCEP:ATP III kriterija, deset od 30 osoba sa ŠBT1 imalo je MS. Ako se kao kriterij za MS uzme vrijednost eGDR ( $\leq 8,45$  mg/kg/min) prema ROC analizi, tada je MS imalo 14 ispitanika sa ŠBT1. Naši rezultati su slični rezultatima Chillaróna (76), u kojega je vrijednost  $eGDR \leq 8,77$  mg/kg/min pokazala 100% osjetljivost i 85,2% specifičnost za prisustvo MS u osoba sa ŠBT1 (N=91).

U osoba sa ŠBT1 koje su imale MS prema vrijednosti eGDR u ROC analizi nađena je pozitivna korelacija između bazalne koncentracije uGLP-1 s postprandijalnom koncentracijom FGF-21. Može biti da osobe koje imaju IR, odnosno MS pokazuju bolju povezanost ova dva hormona. Njihovo djelovanje do sada je najviše i istraživano u osoba s IR te se pokazalo, za inkretinske hormone, da značajno smanjuju IR u osoba sa ŠBT2 (129). Eksperimentalna istraživanja potvrđuju isto u ŠBT1 (171). FGF-21 u eksperimentalnim istraživanjima smanjuje IR (208), te se terapija rekombinantnim FGF-21 nagoviješta kao terapija za smanjenje IR (229, 230). Nedavno je opisano u eksperimentalnim istraživanjima da primjena GLP-1 agonista povećava aktivnost FGF-21 te poboljšava IO (238). Možda se pozitivna povezanost ova dva hormona u osoba koje imaju MS prema vrijednosti eGDR može povezati s ovom činjenicom.

Također, u osoba sa ŠBT1 i MS postprandijalna koncentracija uGLP-1 te odgovor uGLP-1 ( $\Delta$ ) negativno koreliraju s dozom inzulina. To je sukladno pretpostavci da egzogeni inzulin u osoba sa ŠBT1 inhibira lučenje GLP-1 pojačavajući aktivnost DPP-IV enzima. Baš je razlika u postprandijalnoj koncentraciji GLP-1 te odgovoru GLP-1 u osoba s IR pokazala takvu negativnu povezanost s inzulinom, vjerojatno zato što je u tih osoba potrebna veća doza inzulina za jednako djelovanje. Čak se u dosadašnjim radovima opisuju razlike s obzirom na vrstu inzulina (bazalni ili bolus inzulin), no u prikazanom je istraživanju nađena jaka povezanost postprandijalne koncentracije uGLP-1 s bolus inzulinom, a  $\Delta$  uGLP-1 i s bolus i bazalnim inzulinom. Vjerojatno bolus inzulin ima jači neposredni učinak na postprandijalnu koncentraciju GLP-1, što potvrđuje linearna regresija u našem istraživanju.

U osoba koje nisu imale MS prema vrijednosti eGDR u ROC analizi, nađena je negativna korelacija između postprandijalne koncentracije uGLP-1 s lipidemijom. Najjača povezanost je nađena između postprandijalnog uGLP-1 s LDL kolesterolom. Navedeni rezultat govori u prilog činjenici da u osoba sa ŠBT1 s većom IO i bez MS postoji značajna povezanost GLP-1 s parametrima lipidemije. Zašto je ta povezanost samo značajna u osoba bez MS, je li endogena koncentracija GLP-1 u osoba s većom IO bolji odraz prave metaboličke antihiperlipemične aktivnosti GLP-1, za sada ostaje nejasno. Do sada nije opisana na ovakav način povezanost GLP-1 s lipidemijom, stoga rezultati nisu usporedivi.

U osoba sa ŠT1 i bez MS, bazalna koncentracija uGLP-1 negativno korelira s glikemijom natašte. Nađena je povezanost FGF-21 s HDL kolesterolom u istih osoba.

Prikazani rezultati nagovještavaju da u osoba s IR, odnosno MS, nema povezanosti endogenih koncentracija ova dva hormona s glikemijom i lipidemijom; možda uslijed prevelike glukotoksičnosti i lipotoksičnosti uslijed IR. S obzirom na postojanost MS prema eGDR vrijednosti je nađena razlika u koncentraciji ova dva hormona između osoba sa ŠBT1 koje su imale MS i zdravih kontrolnih ispitanika. Nađena je veća koncentracija GLP-1 i FGF-21 u zdravih kontrolnih ispitanika u odnosu na osobe sa ŠBT1 i MS, dok je u osoba

sa ŠBT1 i bez MS nađena razlika samo u koncentraciji GLP-1, bez razlike u koncentraciji FGF-21. Navedeno pokazuje da IR, odnosno MS imaju značajnu ulogu u lučenju ovih hormona, odnosno osobe sa ŠBT1 bez IR i bez MS luče jednaku količinu FGF-21 kao i zdravi kontrolni ispitanici. Vjerojatno je IR jedan od čimbenika u ŠBT1 koji doprinosi manjoj koncentraciji FGF-21 u osoba sa ŠBT1, dok se to za GLP-1 ne može reći. Ili je manje FGF-21 barem djelomično odgovoran za IR. Kakogod, GLP-1 i FGF-21 su u populaciji osoba sa ŠBT1 do sada izrazito malo istraživani, tako da je teško rezultate uspoređivati i donositi neke konačne zaključke. S druge strane, ovo pionirsko istraživanje je baš stoga važno jer daje prve rezultate u ovom području.

## **6.7. Usporedba GLP-1 u plazmi u ispitanika sa ŠBT1 i u zdravih kontrolnih ispitanika**

Nađena je razlika u bazalnim koncentracijama uGLP-1 i aGLP-1 između osoba sa ŠBT1 i zdravih kontrolnih ispitanika. Osobe sa ŠBT1 su imale niže bazalne koncentracije uGLP-1 i aGLP-1, međutim nije bilo razlike između osoba sa ŠBT1 i zdravih kontrolnih ispitanika u postprandijalnim koncentracijama navedenih hormona, niti u odgovoru GLP-1 na hranu. Bazalne koncentracije uGLP-1 i aGLP-1 su neovisno o dobi, spolu i ITM bile veće u zdravih kontrola u usporedbi s osobama sa ŠBT1. Porasla je koncentracija uGLP-1 i aGLP-1 u 30-toj minuti nakon obroka i u osoba sa ŠBT1 i u zdravih kontrolnih ispitanika. Svi ispitanici sa ŠBT1 su primili dozu bazalnog inzulina večer prije vađenja krvi te dozu bolus inzulina ujutro prije doručka. Također su svi ispitanici sa ŠBT1 bili C-peptid negativni. Kalorijska vrijednost doručka bila je prilagođena ITM naših ispitanika.

Prikazani rezultati su djelomično sukladni rezultatima Vilsbølla i sur. (138), koji su također našli nižu bazalnu koncentraciju aGLP-1 u osoba sa ŠBT1 u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu, te pretpostavljaju da bi egzogeni inzulin mogao imati inhibicijski učinak na GLP-1 i biti odgovoran za niže koncentracije. Oni su ispitali osam osoba sa ŠBT1 (6 bez rezidualne  $\beta$ -stanične funkcije) te osam zdravih kontrolnih ispitanika. Uspoređivali su koncentracije hormona natašte i postprandijalno te dvije različite vrste doručka s obzirom na broj kalorija u istih

ispitanika (260 i 520 kcal, od kojih su 33% činile masti, 48% šećer te 19% bjelancevine). Njihovi ispitanici su, kao i naši, primili bazalni inzulin večer prije i bolus inzulin ujutro. Nisu također našli razliku u postprandijalnom odgovoru između osoba sa ŠBT1 te zdravih kontrolnih ispitanika, međutim, našli su razliku u postprandijalnom odgovoru (i u 30-toj minuti) u osoba sa ŠBT1 u odnosu na različiti kalorijski unos za doručak. Osobe s većim unosom kalorija u njih su imale veću postprandijalnu koncentraciju GLP-1 što objašnjavaju većim poticajem hrane na L-stanicu tankog crijeva da luči više GLP-1. Naši rezultati nisu pokazali razliku u postprandijalnom odgovoru GLP-1 u odnosu na broj unesenih kalorija (324 vs 396 vs 433 vs 598 kcal), no sastav našeg obroka je bio drukčiji od Vilsbølla i sur., naš doručak je sadržavao 70% šećera, 25% bjelancevina te 5% masti. Možda je razlika u sadržaju masti uzrok navedenomu. Također, u našem istraživanju nije gledana razlika u koncentracijama hormona u istih osoba s obzirom na različitu kalorijsku vrijednost obroka, već je prema ITM svakom ispitaniku dana određena kalorijska vrijednost za doručak. U naše obje skupine ispitanika (osoba sa ŠBT1 i zdravih kontrola) izmjerena je niža bazalna i postprandijalna koncentracija uGLP-1 i aGLP-1 u usporedbi s rezultatima Vilsbølla i sur.

Suprotno našim rezultatima, Lugari i sur. su opisali jednaku bazalnu koncentraciju aGLP-1 u osoba sa ŠBT1 i zdravih kontrolnih ispitanika (137), međutim, u njihovih ispitanika nije došlo do postprandijalnog porasta koncentracije GLP-1. Oni pretpostavljaju da nedostatak postprandijalnog odgovora nastaje zbog smanjene osjetljivosti L-stanica tankog crijeva uslijed IR, manjka inzulina i kronične hiperglikemije. Ispitali su 16 osoba sa ŠBT1 koje su večer prije dobili bazalni inzulin, no ujutro prije doručka nisu dobili bolus inzulin. Možda je terapija bolus inzulinom uzrok nižih bazalnih koncentracija GLP-1 u osoba sa ŠBT1 u usporedbi sa zdravim kontrolama u našem istraživanju te u istraživanju Vilsbølla i sur., budući da ispitanici u Lugarijevom istraživanju nisu primili bolus inzulina prije doručka.

Istraživanje pak Greenbaumaove i sur. nije pokazalo razliku niti u bazalnim niti u postprandijalnim koncentracijama GLP-1 nakon OGTT između osoba sa ŠBT1 i zdravih kontrolnih ispitanika (144), međutim, opisali su razliku u

smanjenom inkretinskom učinku i nedostatnoj inhibiciji glukagona u osoba sa ŠBT1. Međutim nema podataka o primjeni bazalnog i bolus inzulina u njihovih ispitanika sa ŠBT1 (N=17). Ispitanici u njihovom istraživanju su bili mlađe dobi, manjeg ITM te bolje regulacije glikemije.

Suprotno navedenom, istraživanje Kielgasta i sur. je pokazalo podjednak inkretinski odgovor u osoba sa ŠBT1 bez rezidualne  $\beta$ -stanične funkcije (n=8), s rezidualnom  $\beta$ -staničnom funkcijom (n=8) te u zdravih kontrolnih ispitanika (n=8), a nakon obroka uz kojega je ordinirana istodobna infuzija GLP-1 (145). Pokazali su da egzogeni GLP-1 smanjuje vršnu postprandijalnu glikemiju za 45% bez obzira na rezidualnu  $\beta$ -staničnu funkciju, a da endogeni GLP-1 regulira postprandijalnu glikemiju mijenjajući koncentraciju glukagona i djelujući na pražnjenje želuca i osjetljivost  $\beta$ -stanice na glukozu. Njihove bazalne koncentracije GLP-1 su bile također više u usporedbi s našima. U dosadašnjim spomenutim radovima je korištena drukčija metoda i drukčiji reagens za mjerenje hormona, što je za sada uz karakteristike ispitanika i inzulinsku terapiju vjerojatno jedini mogući razlog različitim koncentracijama GLP-1 između studija.

U našem istraživanju i u osoba sa ŠBT1 i u zdravih kontrolnih ispitanika nađena je pozitivna korelacija između ukupnih s aktivnim vrijednostima GLP-1, međutim statistički značajna linearna regresija je nađena samo u zdravih kontrolnih ispitanika između koncentracije  $\Delta$  uGLP-1 s  $\Delta$  aGLP-1. U dosadašnjim istraživanjima nije slično opisivano, pa ne možemo usporediti. U zdravih kontrola je nađena, čak i u malog broja, jaka postprandijalna pravilnost promjene GLP-1 i FGF-21, koja se u osoba sa ŠBT1 gubi, jer je korelacija puno manje snage. Linearnu regresiju u zdravih kontrolnih ispitanika objašnjavamo održanom fiziološkom regulacijom GLP-1 u zdravih kontrolnih ispitanika, odnosno na temelju sekrecije hormona (uGLP-1) možemo pretpostaviti njegovu pravu aktivnost (aGLP-1). U osoba sa ŠBT1 koncentracije uGLP-1 i aGLP-1 jesu pozitivno povezane, međutim, ne možemo pretpostaviti aktivnost hormona na temelju njegove sekretorne sposobnosti, očito je da je ta os poremećena, odnosno nije fiziološka. Iz navedenog se može naslutiti generalno smanjen kapacitet GLP-1 u osoba sa ŠBT1, nepredvidiv odgovor na unos hrane,

odnosno glikemiju, ali još uvijek prisutnu ulogu u sustavu regulacije glikemije i otvorenu mogućnost terapijskog djelovanja putem iste.

Gledajući koncentraciju GLP-1 s obzirom na spol u osoba sa ŠBT1, nađena je razlika u koncentraciji uGLP-1 0', uGLP-1 30' te  $\Delta$  uGLP-1. Naime, muškarci su imali veće koncentracije navedenih hormona od žena. Do sada je opisan mali broj istraživanja o koncentracijama navedenih hormona s obzirom na spol, odnosno u osoba sa ŠBT1 nema do sada takvih izvješća. Jedno je istraživanje u zdravih kontrolnih ispitanika s normalnom TM opisalo oprečne rezultate našem istraživanju, koje su protumačili većim postotkom tjelesne masti u žena od muškaraca, pa samim time i većom koncentracijom GLP-1 u žena (270). Budući da su u našem istraživanju muškarci imali veći OS/OB mogli bismo pretpostaviti da je to uzrok većoj koncentraciji uGLP-1 u naših muškaraca. Međutim, u multivarijatnoj statistici smo pokazali da je postprandijalna koncentracija GLP-1 veća u muškaraca u odnosu na žene, neovisno o dobi, trajanju bolesti, OS/OB te dozi bolus inzulina. Navedena činjenica u našem istraživanju je suprotna dosadašnjem istraživanju u kojem su žene imale veće koncentracije GLP-1, iako se treba ograditi od generaliziranja, jer je provođeno istraživanje na vrlo specifičnoj i malo istraživanoj populaciji do sada, a to su osobe sa ŠBT1. Na temelju dobivenih rezultata, a bez osvrtnja na patofiziološku podlogu nalazu, može se zaključiti da su muškarci sa ŠBT1 možda bolji kandidati za daljnja istraživanja u vezi s mogućom terapijom lijekovima koji djeluju putem GLP-1. Moguće je da muškarci imaju bolju osovinu hrana-glikemija-GLP-1. Suprotno rezultatima u osoba sa ŠBT1, u zdravih kontrolnih ispitanika nismo našli razliku u koncentraciji GLP-1 s obzirom na spol.

Do sada je opisano da u osoba sa ŠBT1 infuzija GLP-1 smanjuje glikemiju u krvi smanjujući lučenje glukagona u prisutnosti hiperglikemije (142-144), no ne zna se još kojim točno mehanizmom (92, 148, 149). Također je opisana moguća nedostatna inhibicija supresije glukagona uslijed niske koncentracije endogenog GLP-1 te je također opisan mogući stimulacijski učinak GLP-1 na glukagon u C-peptid negativnih bolesnika (137, 141, 144). U prikazanom istraživanju, svi ispitanici sa ŠBT1 su bili C-peptid negativni te su u usporedbi s

drugim dosadašnjim istraživanjima imali niže koncentracije GLP-1 i bazalno i postprandijalno koje možda nisu bile u mogućnosti suprimirati glukagon. Također su naši ispitanici primili dozu bolus inzulina prije doručka koji je možda suprimirao hiperglikemiju nakon obroka te nije omogućio poticaj hiperglikemije na endogeni GLP-1 da djeluje i suprimira lučenje glukagona. Uspoređujući prikazane rezultate s dosadašnjim istraživanjima u osoba ŠBT1, možemo reći da ima sukladnih, ali i oprečnih rezultata (137, 144, 271). U zdravih kontrolnih ispitanika mehanizam djelovanja endogenog GLP-1 na glukagon vjerojatno nije bio aktiviran, zbog održane fiziološke funkcije endogenog inzulina koja je bila dovoljna da regulira glikemiju nakon obroka. Prikazani rezultati pokazuju razliku u postprandijalnoj koncentraciji glukagona u osoba sa ŠBT1 s obzirom na vrijednost unesenih kalorija za doručak. Osobe koje su uzele najviše kalorija za doručak su imale najnižu postprandijalnu koncentraciju glukagona, što bi podržalo hipotezu da kalorijska vrijednost obroka utječe na koncentraciju hormona, bez obzira što nismo našli razliku u koncentraciji GLP-1 s obzirom na broj unesenih kalorija. Ovi rezultati govore u prilog održanju osovine glikemija-glukagon u fiziološkom smjeru, te dodatno argumentira opravdanost budućih istraživanja o djelovanju GLP-1 analoga na glukagon. Nije bilo razlike u dozi inzulina između skupina s različitim kalorijskim unosom, a naše osobe nisu imale svog endogenog inzulina, te vjerojatno smanjena koncentracija glukagona nije uvjetovana egzogenim inzulinom. Suprotno našim rezultatima, Vilsbøll i sur. su opisali porast koncentracije glukagona nakon većeg obroka u osoba sa ŠBT1 (138).

## **6.8. Usporedba FGF-21 u serumu u ispitanika sa ŠBT1 i u zdravih kontrolnih ispitanika**

Nađena je razlika u bazalnoj koncentraciji FGF-21 između osoba sa ŠBT1 i zdravih kontrolnih ispitanika, kao i u odgovoru FGF-21 na hranu. Osobe sa ŠBT1 su imale nižu bazalnu koncentraciju FGF-21 u odnosu na kontrolnu skupinu te nisu imale pad koncentracije postprandijalnog FGF-21, kao zdrava kontrolna skupina koja je imala jasan postprandijalni pad koncentracije FGF-21,

odnosno negativan odgovor FGF-21 nakon obroka. Nije bilo povezanosti između doze inzulina s koncentracijom FGF-21. Koncentracija FGF-21 u naših ispitanika nije ovisila o kalorijskoj vrijednosti obroka. Nakon prilagodbe prema dobi, spolu i ITM i dalje je nađena neovisno niža koncentracija  $\Delta$  FGF-21 u zdravih kontrolnih ispitanika u usporedbi s osobama sa ŠBT1. Nije nađena neovisno niža koncentracija bazalnog FGF-21 u multivarijantnoj statistici između te dvije skupine.

Do sada je opisano samo jedno istraživanje o koncentraciji FGF-21 u osoba sa ŠBT1. Prikazani rezultati su djelomično u skladu s rezultatima Kineza (240). Njihovi ispitanici sa ŠBT1 (N=76) su imali veći medijan bazalne koncentracije FGF-21, međutim oni su u istraživanje uključivali većinom žene mlađe životne dobi s novodijagnosticiranom ŠBT1 uz održanu rezidualnu  $\beta$ -staničnu funkciju gušterače. Naši ispitanici sa ŠBT1 su bili C-peptid negativni što može biti razlogom puno nižih bazalnih koncentracija FGF-21 u prikazanim rezultatima, budući da se i FGF-21 luči i iz gušterače. U dosadašnjim istraživanjima je pretpostavka da je autoimuno uništenje gušterače te posljedično smanjena proizvodnja FGF-21 odgovorna za niže koncentracije FGF-21 u osoba sa ŠBT1. Kinezi opisuju inverznu povezanost između koncentracije FGF-21 s protutijelima na stanice gušterače što mi ne možemo potvrditi, međutim njihovi ispitanici su bili puno mlađe dobi s novodijagnosticiranom ŠBT1, dok naš nemali broj ispitanika nema uopće pozitivna protutijela na gušteraču zbog duljine trajanja ŠB.

U naših zdravih kontrolnih ispitanika vjerojatno postoji fiziološki obrazac lučenja FGF-21. Opisano je da tijekom gladovanja, u metaboličkoj krizi, SMK potiču lučenje FGF-21. Vjerojatno je to razlog normalno većih bazalnih koncentracija FGF-21 u zdravih kontrolnih ispitanika. Međutim nakon obroka, kada se smanji koncentracija SMK nema više dodatnog podražaja za lučenje FGF-21. Metabolička kriza (190), odnosno gladovanje u ovom slučaju, je najveći poticaj za lučenje FGF-21, što je upravo pokazano u naših zdravih kontrolnih ispitanika.

U osoba sa ŠBT1 nema fiziološkog obrasca smanjenja FGF-21 nakon obroka, već koncentracija FGF-21 ostaje gotovo jednaka bazalnim koncentracijama.



Koliko znamo, za sada nije rađeno istraživanje koje uspoređuje bazalne i postprandijalne koncentracije FGF-21 te odgovor FGF-21 na hranu u osoba sa ŠBT1, pa rezultate ne možemo usporediti s dosadašnjima. Istodobno to ovdje dobivene rezultate čini pionirskima, što im daje dodatno značenje u svjetlu vrijednosti istraživanja.

Dosadašnja istraživanja pokazuju velike varijacije u koncentraciji FGF-21 i u zdravih i u osoba sa ŠB, za koje pretpostavljaju da najviše ovise o koncentraciji SMK, koje su najveći poticaj za njegovo lučenje. Velik je referentni raspon FGF-21 u zdravih kontrolnih ispitanika (200-202) što se može potvrditi i u našem istraživanju. Paradokсно povišene koncentracije FGF-21 u osoba sa ŠBT2 i drugim stanjima s IR vjerojatno se mogu pripisati kompenzacijskom lučenju ili rezistenciji na FGF-21 (213, 214, 216), uz ostatnu endogenu  $\beta$ -staničnu funkciju u tim stanjima. Budući da FGF-21 ima brojne zaštitne metaboličke učinke, za sada dokazane samo u eksperimentalnim modelima (229, 230), vjerojatno zbog nižih endogenih koncentracija FGF-21 u osoba sa ŠBT1 ti učinci ne dolaze do izražaja, te bi terapija rekombinantnim FGF-21 kao i u životinjskim modelima imala svoju ulogu.

U prikazanom istraživanju je nađena veća bazalna koncentracija FGF-21 u žena sa ŠBT1 u odnosu na muškarce, ali samo u univarijatnoj statistici. Koliko znamo do sada nije opisivana razlika u koncentraciji FGF-21 s obzirom na spol u osoba sa ŠBT1. Možda je razlika u spolnim hormonima odgovorna za različite koncentracije ovog hormona ili je moguće razlika u koncentraciji hormona s obzirom na spol usko specifično vezana uz patologiju bolesti, ovdje ŠBT1. Dosadašnja istraživanja o FGF-21 s obzirom na spol u drugim stanjima koja nisu ŠB su različita, međutim, većinom nije bilo razlike u koncentraciji FGF-21 s obzirom na spol (203), a u jednom je istraživanju opisana niža bazalna koncentracija u zdravih žena u odnosu na zdrave muškarce (204), dok je u novijem istraživanju viša koncentracija FGF-21 u žena objašnjena višom koncentracijom triglicerida (205). U naših zdravih kontrolnih ispitanika nije nađena razlika u koncentraciji FGF-21 s obzirom na spol.

## **6.9. Povezanost GLP-1 i FGF-21 s dobi, trajanjem ŠBT1, ITM, OS i krvnim tlakom u ispitanika sa ŠBT1**

Prikazana je razlika u postprandijalnoj koncentraciji aGLP-1 s obzirom na trajanje ŠBT1. Naime osobe s kraćim trajanjem ŠBT1 imale su veću postprandijalnu koncentraciju aGLP-1. Nije nađena povezanost koncentracija GLP-1 i FGF-21 s dobi, ITM i OS u osoba sa ŠBT1.

U dosadašnjim istraživanjima o GLP-1 postoje izvješća o nižim koncentracijama GLP-1 u osobama sa ŠBT2 starije dobi te duljeg trajanja bolesti (119, 120). Također postoje istraživanja u osoba sa ŠBT2 koja opisuju negativnu povezanost ITM s postprandijalnom koncentracijom GLP-1 (119, 121). Callan je, međutim, nedavno u sustavnom pregledu pokazao da ITM nije prediktivni čimbenik lučenja GLP-1 u osoba sa ŠBT2 (118). U osoba sa ŠBT1 različita su izvješća o povezanosti duljine trajanja bolesti s koncentracijom GLP-1. Moguće je da s trajanjem ŠBT1 dolazi do iscrpljena L-stanica tankog crijeva te manje mogućnosti lučenja GLP-1 (118, 122). U ŠBT2 mijenja se profil lučenja GLP-1 tijekom progresije bolesti, a možda postoji sličan obrazac i u osoba sa ŠBT1.

U dosadašnjim istraživanjima o koncentraciji FGF-21, najviše za sada u osoba sa ŠBT2 i/ili IR, opisuje se pozitivna korelacija između FGF-21 s pretilošću i ITM (213, 217, 222), mada postoje i istraživanja u kojima nisu našli povezanost između FGF-21 s mjerama pretilosti (186, 225, 226). Do sada u osoba sa ŠBT1 nije opisana povezanost koncentracije FGF-21 s mjerama pretilosti, duljinom trajanja bolesti i dobi. U ovom istraživanju ispitanici sa ŠBT1 su imali medijan trajanja ŠBT1 dulji u usporedbi s novodijagnosticiranim osobama sa ŠBT1 u Kineza (240), te su ispitanici u ovom istraživanju imali nižu koncentraciju FGF-21 od kineskih ispitanika, što bismo možda mogli povezati s trajanjem bolesti i dobi. Međutim, njihovi su ispitanici bili manjeg ITM, što bi govorilo protiv povezanosti koncentracije FGF-21 s ITM.

## **6.10. Zaključak rasprave**

Prikazano istraživanje je provedeno s ciljem saznavanja o endogenim koncentracijama GLP-1 (uGLP-1 i aGLP-1) i FGF-21 i njihovom međusobnom odnosu te utvrđivanja povezanosti koncentracija GLP-1 i FGF-21 u krvi s

regulacijom glikemije, lipidemijom i postojećim mikrovaskularnim komplikacijama u osoba sa ŠBT1. Također je cilj bio ispitati povezanost ova dva hormona s IR (mjerenu pomoću eGDR), koja je temeljni patofiziološki čimbenik MS te neovisni rizični čimbenik razvoja mikrovaskularnih komplikacija (55-60) te ispitati povezanost GLP-1 i FGF-21 s prevalencijom MS u osoba sa ŠBT1, budući da je učestalost MS predskazatelj kroničnih komplikacija u osoba sa ŠBT1 (67). Dosadašnja istraživanja u općoj populaciji te u osoba sa ŠB, većinom ŠBT2, su pokazala da GLP-1 i FGF-21, odnosno njihovi analozi, smanjuju IR te da posjeduju antihiperglikemijske i antilipidemijske učinke (79, 87-90), (191-193), (196, 197). Možda bismo terapijom GLP-1 i FGF-21 analozima u osoba sa ŠBT1, uz postojeću inzulinsku terapiju, mogli pridonijeti boljoj glikemiji, lipidemiji te smanjenju IR (110, 130-133, 208), a na taj način spriječiti nastanak mikrovaskularnih komplikacija. U eksperimentalnim istraživanjima primjena GLP-1 agonista povećava aktivnost FGF-21 te na taj način poboljšava IO (238). Zbog navedenoga, proučili smo također međusobni odnos endogenih koncentracija GLP-1 i FGF-21. S obzirom na dosadašnje dvojbene spoznaje o koncentracijama GLP-1 i FGF-21 u osoba sa ŠBT1 (137, 138, 140), (240), izmjerili smo koncentracije navedenih hormona i u zdravih kontrolnih ispitanika. Proučili smo postoji li razlika u koncentraciji navedenih hormona između ispitanika sa ŠBT1 i zdravih kontrolnih ispitanika. Temeljem navedenoga mogli bismo pretpostaviti ima li u budućnosti mjesta terapiji GLP-1 i FGF-21 analozima u osoba sa ŠBT1, naravno uz postojeću inzulinsku terapiju. Ispitana je također povezanost GLP-1 s koncentracijom glukagona, budući da je opisano da u osoba sa ŠBT1 terapija GLP-1 analozima smanjuje glikemiju djelujući na lučenje glukagona (145-147). Zbog mogućeg djelovanja egzogenog inzulina na koncentracije GLP-1 i FGF-21 (155-157), (241, 242), za sada još uvijek dvojbenoga, ispitana je povezanost ova dva hormona s inzulinskom terapijom u osoba sa ŠBT1. U navedeno su istraživanje uključeni su ispitanici sa ŠBT1 koji nisu imali svog endogenog inzulina, kako bi uzorak bio homogeniji te kako bismo mogli otkloniti mogući utjecaj endogenog inzulina na koncentracije mjerenih hormona. U svih ispitanika mjerene su koncentracije hormona natašte i postprandijalno. Zbog financijskih, ali i tehničkih ograničenja,

nismo bili u mogućnosti mjeriti koncentraciju SMK u krvi naših ispitanika, kao niti koncentracije hormona u duplikatu, što bi sigurno dalo veću vjerodostojnost rezultatima našeg istraživanja. Svi su ispitanici bili odrasli, iste rase, bez značajne razlike u spolnoj zastupljenosti, iz istog zemljopisnog područja, i svi su kontrolirani u jednom središtu s ujednačenim pristupom liječenja. Ovi se rezultati stoga uvjetno mogu smatrati specifičnima za središte. Uspoređujući karakteristike naše skupine ispitanika sa ŠBT1 s nacionalnim pokazateljima (Poljičanin T. Sprega debljine i šećerne bolesti: magistarski rad. Zagreb: Prirodoslovno-matematički fakultet; 2004.) gdje je bilo uključeno 1503 osoba sa ŠBT1, 480 muškaraca, medijana dobi 35 godina, trajanja ŠBT1 14 godina i ITM  $24 \text{ kg/m}^2$ , zaključujemo da su naši ispitanici bili sličnog medijana dobi ŠBT1 (37 godina), duljeg trajanja bolesti (22 godine medijan) te istog ITM ( $24 \text{ kg/m}^2$ ), što čini reprezentativan uzorak. Nismo u mogućnosti zaključivati o uzročnoj povezanosti naših rezultata, budući da se radi o presječnom istraživanju. Veći broj ispitanika bi dao pouzdanije zaključke o povezanosti koncentracija GLP-1 i FGF-21 s navedenim obilježjima u ovoj populaciji, i s etničkog gledišta i s gledišta ove specifične vrste ispitanika. Budući da ta takva velika populacijska istraživanja općenito nedostaju, ne samo za ovo etničko i rasno područje nego za bilo koje, tada je opravdano komentiranje naših rezultata u usporedbi s drugim objavljenim izvješćima na također manjim uzorcima ispitanika.

Rezultati prikazanog istraživanja djelomično potvrđuju postavljenu hipotezu, a djelomično ne dokazuju. Nađena je devijacija bazalnih koncentracija GLP-1 i FGF-21 oboljelih od ŠBT1 u odnosu na zdrave ispitanike. Neovisno snižen bazalni GLP-1 u osoba sa ŠBT1 potvrđuje moguću korist od primjene inkretinske terapije u osoba sa ŠBT1. Zbog jake postprandijalne pravilnosti promjene ukupnog i aktivnog GLP-1 u zdravih kontrolnih ispitanika, čak i u tako malog broja, možemo svakako zaključiti da je metoda mjerenja ispitivanih hormona pravilna. Ta pravilnost promjene GLP-1 se u osoba sa ŠBT1 gubi jer je korelacija puno manje snage. Zbog neproporcionalnog odnosa u osoba sa ŠBT1 između hormona koji upućuje na sekretornu sposobnost crijeva (uGLP-1) te hormona koji upućuje na pravu aktivnost u organizmu (aGLP-1) bit će vjerojatno kompliciranije izračunati kolika je to doza GLP-1 analoga potrebna za

farmakološki učinak hormona ekvivalentan fiziološkomu. Sniženi bazalni FGF-21 u osoba sa ŠBT1 upućuje na moguću pozitivnu korist od terapije rekombinantnim FGF-21. Danas se već izrađuju farmakološki patentni FGF-21 u svrhu liječenja IR, pretilosti i ŠBT2. Naravno potrebna su dodatna klinička istraživanja za potvrdu istoga u osoba sa ŠBT1. Trebalo bi napraviti i dodatno istraživanje u zdravih kontrolnih ispitanika da se vidi ima li odgovor FGF-21 na hranu ( $\Delta$ ) mjesto u (pato)fiziologiji metabolizma glukoze i lipida ili je to samo slučajan nalaz u našem istraživanju. U prikazanom istraživanju osoba sa ŠBT1 nađene su oprečne endogene koncentracije GLP-1 i FGF-21 s obzirom na glikemiju i HbA1c, kao što je i bilo pretpostavljeno u hipotezi istraživanja, a bez obzira što su oba hormona metabolički zaštitna u pogledu glikemije. U ovako specifičnoj ispitivanoj skupini još mnogi učinci nisu do kraja jasni. Istraživanje nije potvrdilo povezanost između koncentracije GLP-1 i FGF-21 s dijabetičkom retinopatijom i nefropatijom, dok je nađena određena povezanost s dijabetičkom neuropatijom. Temeljem rezultata prikazanog istraživanja s velikom se vjerojatnošću može zaključiti da GLP-1 i FGF-21, svaki za sebe, a i u međudjelovanju zajedno, imaju značajnu ulogu u patofiziologiji ŠBT1 te je moguć budući terapijski doprinos uz postojeću inzulinsku terapiju. Istraživanje GLP-1 i FGF-21 u osoba sa ŠBT1 polazi od pretpostavki utemeljenih na dosadašnjim dvojbenim i rijetkim spoznajama i završava rezultatima koji te dvojbe u nekim aspektima rasvjetljavaju, a u nekima produbljuju. Otkrivaju se i neke nove značajne spoznaje o koncentracijama GLP-1 i FGF-21 u osoba sa ŠBT1. Rješenje bi dale velika prospektivna multicentrična istraživanja u osoba sa ŠBT1 ujednačenih kriterija i nacрта, uz uvažavanje svih do sada nađenih izvora i iskrivljenja.

## 7. ZAKLJUČCI

Za sada nema objavljenih usporedivih podataka o koncentracijama, povezanosti i međusobnom odnosu GLP-1 (uGLP-1 i aGLP-1) i FGF-21 u osoba sa ŠBT1 u hrvatskoj populaciji. U prikazanom istraživanju djelomično se potvrđuje postavljena hipoteza istraživanja, dok pojedine tvrdnje ovim istraživanjem nisu dokazane.

1. Viša koncentracija bazalnog i postprandijalnog uGLP-1 je bila povezana s nižom glikemijom natašte, dok je bazalni uGLP-1 i u multiploj linearnoj regresiji neovisno o dobi, ITM i trajanju ŠBT1 bio povezan s glikemijom natašte. Ovi rezultati su sukladni pozitivnom terapijskom učinku GLP-1 analoga na regulaciju glikemije. Za sada, ovi rezultati postavljaju preliminarne temelje mogućoj farmakološkoj terapiji bolesnika sa ŠBT1 zasnovanoj na GLP-1.

2. Viša koncentracija postprandijalnog uGLP-1 je bila povezana s nižom koncentracijom ukupnog kolesterola neovisno o dobi, trajanju ŠBT1 te terapiji statinom. Viša koncentracija ukupnog i aktivnog GLP-1 je bila povezana s nižim koncentracijama HDL i LDL kolesterola, iako samo u univarijatnoj analizi. Postprandijalne vrijednosti GLP-1 su pokazale jaču povezanost s parametrima lipidemije. Na temelju navedenoga zaključujemo da GLP-1 ima povoljan učinak na lipidemiju, pa se to može očekivati i od GLP-1 analoga; što je još jedan od razloga za važnost primjene inkretinske terapije u osoba sa ŠBT1.

3. Viša koncentracija GLP-1 nije bila povezana s nižom prevalencijom dijabetičke nefropatije i dijabetičke retinopatije. Viša koncentracija bazalnog aGLP-1 je bila povezana s nižom prevalencijom dijabetičke neuropatije, međutim granične statističke značajnosti. Nađena je značajna razlika u koncentraciji GLP-1 s obzirom na različite podvrste dijabetičke neuropatije. Osobe koje su imale simetričnu neuropatiju su imale nižu bazalnu koncentraciju aGLP-1 u odnosu na osobe bez neuropatije te osobe koje su pripadale kvartili s

najnižom koncentracijom bazalnog aGLP-1 su imale najveću učestalost dijabetičke neuropatije.

4. Nađena je pozitivna povezanost između bazalnog FGF-21 s HbA1c (niža koncentracija FGF-21 je bila povezana s boljom regulacijom glikemije), iako nedovoljno statistički značajno u univarijatnoj statistici. Međutim, u multiploj linearnoj regresiji koncentracija bazalnog FGF-21 je bila statistički značajno povezana s HbA1c neovisno o dobi. Do sada, koliko je poznato prema pregledu objavljenih izvješća, nije opisivana povezanost koncentracije FGF-21 s regulacijom glikemije u osoba sa ŠBT1 te će biti potrebna daljnja istraživanja da potvrde ili ospore naše rezultate.

5. Koncentracija FGF-21 nije pokazala jasnu povezanost s parametrima lipidemije. Jedino je nađena pozitivna povezanost između bazalne koncentracije FGF-21 s HDL3 kolesterolom te između postprandijalne koncentracije FGF-21 s HDL i HDL3 kolesterolom. U zdravih kontrolnih ispitanika također nismo našli povezanost FGF-21 s parametrima lipidemije što bi uputilo na to da je FGF-21 irelevantan za lipidemiju u ljudi. Međutim potrebne su također kliničke studije koje će ispitati učinak FGF-21 na lipidemiju u osoba sa ŠBT1 u nepresječnom modelu.

6. Niža koncentracija FGF-21 nije bila povezana s nižom prevalencijom dijabetičke nefropatije i dijabetičke retinopatije. Nađena je razlika u koncentraciji FGF-21 s obzirom na različite podvrste dijabetičke neuropatije. U skupini osoba koja je imala povećanu IO, nađena je veća koncentracija FGF-21 u osoba s drugim stupnjem dijabetičke polineuropatije u odnosu na osobe s početnim ili prvim stupnjem dijabetičke neuropatije.

7. Nije nađena povezanost koncentracija GLP-1 s FGF-21 niti u osoba sa ŠBT1 niti u zdravih kontrolnih ispitanika. U muškaraca sa ŠBT1 postoji pozitivna korelacija između bazalne koncentracije uGLP-1 s natašte i postprandijalnom koncentracijom FGF-21. U žena sa ŠBT1 nije nađena takva povezanost.

Također u osoba s IR postoji povezanost između bazalne koncentracije uGLP-1 s postprandijalnom koncentracijom FGF-21. U zdravoj kontrolnoj skupini nije bilo povezanosti ovih hormona ni u jednog spola. Do sada nije ispitivana povezanost između endogenih koncentracija GLP-1 s FGF-21 niti u zdravih ispitanika niti u osoba sa ŠBT1, tako da je svaki rezultat vrijedan pažnje. Naši rezultati opisuju samo povezanost ova dva hormona, a nikako uzročnu vezu.

8. Nije nađena povezanost GLP-1 s eGDR, odnosno IR u osoba sa ŠBT1. Nađena je povezanost između koncentracije uGLP-1 s prisutnosti MS u osoba sa ŠBT1 definiranog prema NCEP:ATP III kriterijima. Osobe koje imaju MS su imale veće koncentracije postprandijalnog uGLP-1 te  $\Delta$  uGLP-1. Također gledajući navedene koncentracije hormona s obzirom na broj prisutnih kriterija MS, nađena je veća koncentracija postprandijalnog uGLP-1 i  $\Delta$  uGLP-1 u osoba koje su imale tri kriterija u odnosu na osobe s jednim prisutnim kriterijem MS. Veći uGLP-1 u osoba sa ŠBT1 i MS, što je pokazano ranije i u osoba bez ŠB, upućuje na moguću „GLP-1 rezistenciju“ u osoba sa ŠBT1.

9. Nije nađena povezanost između koncentracija glukagona s GLP-1, niti u osoba sa ŠBT1 niti u zdravih kontrolnih ispitanika. Prikazane endogene koncentracije GLP-1 su vjerojatno toliko niske da nisu u stanju bez dodatne pomoći izvana djelovati na koncentraciju glukagona.

10. Nije nađena povezanost koncentracija GLP-1 s ukupnom dnevnom dozom, bolus i/ili bazalnim inzulinom. Opisana je značajna povezanost hormona s inzulinom u osoba s IR, što može biti predskazatelj da je jača povezanost u onih osoba sa ŠBT1 koje trebaju više inzulina za jednaki učinak na glikemiju.

11. Osobe s većom koncentracijom FGF-21 imale su veću inzulinsku IO, prema vrijednosti eGDR. To potvrđuje već ranije navedenu činjenicu da je izgleda IO u osoba sa ŠBT1 ta koja pogoduje većoj endogenoj koncentraciji FGF-21. Ne možemo rezultate usporediti s drugim ispitanicima sa ŠBT1 jer nisu istraživani,



ali možemo reći da su rezultati oprečni dosadašnjim saznanjima o FGF-21 i IR u osoba sa ŠBT2. Moguće je da patofiziologija ŠBT1 igra ulogu u tome.

12. Postprandijalna koncentracija FGF-21 je pozitivno korelirala s bazalnom vrijednosti glukagona. Do sada je jedno istraživanje opisalo da primjena glukagona u zdravih i osoba sa ŠBT1 povišuje koncentraciju FGF-21.

13. Nije nađena povezanost koncentracija FGF-21 s ukupnom dnevnom dozom, bolus i/ili bazalnim inzulinom.

14. U osoba sa ŠBT1 koje su imale MS prema vrijednosti eGDR u ROC analizi nađena je pozitivna korelacija između bazalne koncentracije uGLP-1 s postprandijalnom koncentracijom FGF-21. Može biti da osobe koje imaju IR, odnosno MS pokazuju bolju povezanost ova dva hormona. Također u istih ljudi postprandijalna koncentracija uGLP-1 te odgovor uGLP-1 ( $\Delta$ ) značajno negativno koreliraju s dozom inzulina. To je sukladno činjenici da egzogeni inzulin u osoba sa ŠBT1 inhibira lučenje GLP-1 pojačavajući aktivnost DPP-IV enzima. U osoba koje nisu imale MS prema vrijednosti eGDR u ROC analizi, nađena je negativna korelacija između postprandijalne koncentracije uGLP-1 s lipidemijom, gdje je najjača povezanost bila između postprandijalnog uGLP-1 s LDL kolesterolom što je dodatna potvrda o povoljnom učinku GLP-1 na lipidemiju. Nađena je povezanost koncentracije FGF-21 s HDL kolesterolom u osoba bez MS što upućuje na mogući povoljan učinak FGF-21 na parametre lipidemije u osoba s povišenom IO.

15. Osobe sa ŠBT1 su imale niže bazalne koncentracije uGLP-1 i aGLP-1 neovisno o dobi, spolu i ITM u odnosu na zdrave kontrolne ispitanike, međutim, nije bilo razlike u postprandijalnim koncentracijama navedenih hormona, niti u odgovoru GLP-1 na hranu između osoba sa ŠBT1 i zdravih kontrolnih ispitanika. Snižene bazalne koncentracije uGLP-1 i aGLP-1 u osoba sa ŠBT1 potvrđuju moguću korist primjene inkretinske terapije u osoba sa ŠBT1, uz postojeću inzulinsku terapiju. Porasla je koncentracija uGLP-1 i aGLP-1 u 30-toj

minuti u osoba sa ŠBT1 i u zdravih kontrolnih ispitanika što potvrđuje fiziološki poticaj za lučenje GLP-1 nakon unosa hrane u obje skupine ispitanika te upućuje na mogući još veći postprandijalni skok GLP-1 u osoba sa ŠBT1 uz uvjet da su veće bazalne koncentracije, odnosno da unesemo GLP-1 izvana. Nema razlike u postprandijalnom odgovoru GLP-1 u odnosu na broj unesenih kalorija za doručak između različitih ispitanika, možda zbog manjeg postotka masti u hrani naših ispitanika ili zbog toga što nije gledana razlika u koncentracijama hormona u istih osoba s obzirom na različitu kalorijsku vrijednost obroka. U obje skupine ispitanika izmjerena je niža bazalna i postprandijalna koncentracija uGLP-1 i aGLP-1 u usporedbi s dosadašnjim objavljenim istraživanjima u osoba sa ŠBT1. U dosadašnjim istraživanjima uporabljeni su različiti postupci i reagensi za mjerenje hormona, što su za sada, uz pojedinačne karakteristike ispitanika, trajanje bolesti, vrstu i dozu inzulinske terapije, jedini mogući razlog različitim koncentracijama GLP-1 između različitih istraživanja. U osoba sa ŠBT1 i u zdravih kontrolnih ispitanika nađena je pozitivna korelacija između ukupnih vrijednosti GLP-1 s aktivnim vrijednostima GLP-1, dok je snaga korelacije bila veća u zdravih kontrolnih ispitanika. Navedeni rezultat upućuje na ispravnost metode mjerenja GLP-1 u naših ispitanika. Muškarci su imali veće koncentracije uGLP-1 0', uGLP-1 30' te  $\Delta$  uGLP-1 od žena u univarijatnom modelu te veću koncentraciju uGLP-1 30' neovisno o dobi, trajanju bolesti i OS/OB. Na temelju dobivenih rezultata, može se zaključiti da su muškarci sa ŠBT1 možda bolji kandidati za daljnja istraživanja u vezi s mogućom terapijom lijekovima koji djeluju putem GLP-1 te da će možda trebati različit pristup terapiji. U zdravih kontrolnih ispitanika nije nađena razlika u koncentraciji GLP-1 s obzirom na spol.

16. Osobe sa ŠBT1 su imale nižu bazalnu koncentraciju FGF-21 u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu te nisu imale postprandijalno sniženje koncentracije FGF-21. Kontrolna skupina zdravih ispitanika je imala jasan postprandijalni pad koncentracije FGF-21, odnosno negativan odgovor FGF-21 nakon obroka ( $\Delta$ ) koji je bio niži od osoba sa ŠBT1 neovisno o dobi, spolu i ITM. Nije bilo povezanosti između doze inzulina s koncentracijom FGF-21 što bi značilo da

egzogeni inzulin u našem istraživanju vjerojatno nema učinka na koncentraciju FGF-21, budući da osobe nisu imale endogenog inzulina jer su bile C-peptid negativne. Koncentracija FGF-21 u naših ispitanika nije ovisila o kalorijskoj vrijednosti obroka. Veća bazalna koncentracija FGF-21 nađena je u žena sa ŠBT1 u odnosu na muškarce. Koliko znamo do sada nije opisivana razlika u koncentraciji FGF-21 s obzirom na spol u osoba sa ŠBT1. U zdravih kontrolnih ispitanika nije nađena razlika u koncentraciji FGF-21 s obzirom na spol. Možda je razlika u spolnim hormonima odgovorna za različite koncentracije ovog hormona ili je moguće razlika u koncentraciji hormona s obzirom na spol usko specifično vezana uz patologiju bolesti, ovdje ŠBT1.

## 8. SAŽETAK

**Cilj.** Ispitati povezanost koncentracija peptida 1 sličnog glukagonu (GLP-1) i čimbenika rasta fibroblasta-21 (FGF-21) s glikemijom, lipidemijom i mikrovaskularnim komplikacijama u osoba sa šećernom bolesti tipa 1 (ŠBT1). Analizirati međuodnos GLP-1 i FGF-21 te ispitati povezanost GLP-1 i FGF-21 s inzulinskom rezistencijom (IR), metaboličkim sindromom (MS), glukagonom i dnevnom dozom inzulina. Usporediti koncentracije GLP-1 i FGF-21 između osoba sa ŠBT1 i zdravih kontrolnih ispitanika.

**Metode i ispitanici.** U 30 osoba sa ŠBT1 te 10 zdravih ispitanika izmjerene su plazmatske koncentracije GLP-1 i FGF-21 postupkom ELISA. Podaci su analizirani pomoću statističkog programa SPSS 15.0, a značajnost je prihvaćena na razini  $P < 0,05$ .

**Rezultati.** Viša koncentracija GLP-1 je bila statistički značajno neovisno povezana s nižom glikemijom natašte te s nižom koncentracijom ukupnog kolesterola. Viša koncentracija GLP-1 nije bila povezana s nižom prevalencijom dijabetičke nefropatije i dijabetičke retinopatije, a bila je povezana s nižom prevalencijom dijabetičke neuropatije. Niža koncentracija bazalnog FGF-21 je bila statistički značajno neovisno povezana s boljom regulacijom glikemije. Koncentracija FGF-21 nije bila povezana s parametrima lipidemije. Niža koncentracija FGF-21 nije bila povezana s nižom prevalencijom dijabetičke nefropatije i dijabetičke retinopatije, međutim, nađena je razlika u koncentraciji FGF-21 s obzirom na različite stupnjeve dijabetičke neuropatije, a istodobno ovisno i o inzulinskoj osjetljivosti (IO). U bolesnika s većom IO viši stupanj dijabetičke neuropatije bio je praćen većom koncentracijom FGF-21. Nije nađena povezanost GLP-1 s FGF-21 ni GLP-1 s glukagonom. Postprandijalni FGF-21 je pozitivno korelirao s bazalnom vrijednosti glukagona. Statistički značajno veći GLP-1 nađen je u osoba s MS. Osobe s većom koncentracijom FGF-21 imale su statistički značajno veću IO. Nije nađena povezanost GLP-1 i FGF-21 s dnevnom dozom inzulina. Osobe sa ŠBT1 su imale statistički značajno niže bazalne koncentracije GLP-1 i FGF-21 u odnosu na zdrave kontrolne ispitanike.

**Zaključak.** Veća koncentracija GLP-1 je bila neovisno povezana s nižom glikemijom natašte te s nižom koncentracijom ukupnog kolesterola. Niža koncentracija FGF-21 je bila povezana s boljom regulacijom glikemije, dok nije bila povezana s boljim lipidnim profilom. Nađena je devijacija bazalnih koncentracija GLP-1 i FGF-21 oboljelih od ŠBT1 u odnosu na zdrave ispitanike. Temeljem rezultata prikazanog istraživanja s velikom se vjerojatnošću može zaključiti da GLP-1 i FGF-21 imaju značajnu ulogu u patofiziologiji ŠBT1. Stoga je uz postojeću inzulinsku terapiju moguć na njima temeljen budući terapijski doprinos i u osoba sa ŠBT1.

## 9. SUMMARY

**The relationship of plasma concentrations of glucagone-like peptide 1 and fibroblast growth factor-21 with glucoregulation, lipidemia and microvascular complications in diabetes mellitus type 1 individuals. Karin Zibar, 2015.**

**Aim.** To examine relationship of glucagon-like peptide 1 (GLP-1) and fibroblast growth factor- 21 (FGF-21) with glycemia, lipidemia and microvascular complications in type 1 diabetes mellitus (T1DM) patients. To analyze mutual relation between GLP-1 and FGF-21 and to examine relationship of GLP-1 and FGF-21 with insulin resistance (IR), metabolic syndrome (MS), glucagon and daily insulin dosage, respectively. To compare GLP-1 and FGF-21 concentrations between T1DM patients and healthy controls, respectively.

**Materials and methods.** In 30 T1DM patients and 10 healthy controls GLP-1 and FGF-21 concentrations were measured by ELISA. Data were analyzed by SPSS 15.0 with statistical significance at  $P < 0.05$ .

**Results.** Higher GLP-1 was statistical significantly independently related to the lower fasting glycaemia and lower total cholesterol concentration, respectively. Higher GLP-1 was not related to the lower diabetic nephropathy or diabetic retinopathy prevalence, respectively, but it was related to the lower prevalence of diabetic neuropathy, at marginal significance level. Lower basal FGF-21 was statistical significantly independently associated with better glycaemia control. FGF-21 was not related to lipidaemia parameters. Lower FGF-21 was not associated with lower diabetic nephropathy or diabetic retinopathy, respectively. However, significant difference in FGF-21 was related to the different diabetic neuropathy stages and insulin sensitivity (IS), at the same time. Patients with higher IS and more severe diabetic neuropathy stage had higher FGF-21. GLP-1 concentration was not related to FGF-21 concentration and the GLP-1 was not related to the glucagon concentration. Postprandial FGF-21 positively correlated with basal glucagon. Statistical significantly higher GLP-1 was found in patients with MS. Patients with higher FGF-21 concentrations had statistical significantly better IS. GLP-1 and FGF-21 concentrations did not correlate with

daily insulin dosage, respectively. T1DM patients had statistical significantly lower basal GLP-1 and FGF-21 than healthy controls, respectively.

**Conclusion.** Higher GLP-1 concentration was independently related with lower fasting glycaemia and with lower total cholesterol concentration, respectively. Lower FGF-21 was associated with better glycaemia control, but not with better lipid profile. Significant deviation of basal GLP-1 and FGF-21 was found in T1DM patients in comparison with healthy controls. The results of the research support an important role of GLP-1 and FGF-21 in the pathogenesis of T1DM. Therefore, future therapy based on the hormones seems possible also in T1DM patients, along with insulin therapy.

## 10. POPIS LITERATURE

1. Bennett PH. Impact of the new WHO classification and diagnostic criteria. *Diabetes, obesity & metabolism*. 1999 Sep;1 Suppl 2:S1-6. PubMed PMID: 11221797.
2. World Health Organization G. Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycemia. 2006.
3. Selvin E, Crainiceanu CM, Brancati FL, Coresh J. Short-term variability in measures of glycemia and implications for the classification of diabetes. *Archives of internal medicine*. 2007 Jul 23;167(14):1545-51. PubMed PMID: 17646610.
4. Atkinson MA, Maclaren NK. The pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *The New England journal of medicine*. 1994 Nov 24;331(21):1428-36. PubMed PMID: 7969282.
5. Greenbaum CJ, Anderson AM, Dolan LM, Mayer-Davis EJ, Dabelea D, Imperatore G, et al. Preservation of beta-cell function in autoantibody-positive youth with diabetes. *Diabetes care*. 2009 Oct;32(10):1839-44. PubMed PMID: 19587365. Pubmed Central PMCID: 2752937.
6. Madsbad S. Prevalence of residual B cell function and its metabolic consequences in Type 1 (insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia*. 1983 Mar;24(3):141-7. PubMed PMID: 6341142.
7. Gepts W. Pathologic anatomy of the pancreas in juvenile diabetes mellitus. *Diabetes*. 1965 Oct;14(10):619-33. PubMed PMID: 5318831.
8. Bottazzo GF, Florin-Christensen A, Doniach D. Islet-cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies. *Lancet*. 1974 Nov 30;2(7892):1279-83. PubMed PMID: 4139522.
9. Savola K, Bonifacio E, Sabbah E, Kulmala P, Vahasalo P, Karjalainen J, et al. IA-2 antibodies--a sensitive marker of IDDM with clinical onset in childhood and adolescence. *Childhood Diabetes in Finland Study Group. Diabetologia*. 1998 Apr;41(4):424-9. PubMed PMID: 9562346.
10. Bingley PJ, Christie MR, Bonifacio E, Bonfanti R, Shattock M, Fonte MT, et al. Combined analysis of autoantibodies improves prediction of IDDM in islet cell antibody-positive relatives. *Diabetes*. 1994 Nov;43(11):1304-10. PubMed PMID: 7926304.
11. Kulmala P, Savola K, Petersen JS, Vahasalo P, Karjalainen J, Lopponen T, et al. Prediction of insulin-dependent diabetes mellitus in siblings of children with diabetes. A population-based study. *The Childhood Diabetes in Finland Study Group. The Journal of clinical investigation*. 1998 Jan 15;101(2):327-36. PubMed PMID: 9435304. Pubmed Central PMCID: 508571.
12. Verge CF, Gianani R, Kawasaki E, Yu L, Pietropaolo M, Jackson RA, et al. Prediction of type I diabetes in first-degree relatives using a combination of insulin, GAD, and ICA512bdc/IA-2 autoantibodies. *Diabetes*. 1996 Jul;45(7):926-33. PubMed PMID: 8666144.
13. Mallone R, Martinuzzi E, Blancou P, Novelli G, Afonso G, Dolz M, et al. CD8+ T-cell responses identify beta-cell autoimmunity in human type 1 diabetes. *Diabetes*. 2007 Mar;56(3):613-21. PubMed PMID: 17327428.



14. Stadinski BD, Delong T, Reisdorph N, Reisdorph R, Powell RL, Armstrong M, et al. Chromogranin A is an autoantigen in type 1 diabetes. *Nature immunology*. 2010 Mar;11(3):225-31. PubMed PMID: 20139986. Pubmed Central PMCID: 3166626.
15. Pietropaolo M, Eisenbarth GS. Autoantibodies in human diabetes. *Current directions in autoimmunity*. 2001;4:252-82. PubMed PMID: 11569406.
16. Winer S, Tsui H, Lau A, Song A, Li X, Cheung RK, et al. Autoimmune islet destruction in spontaneous type 1 diabetes is not beta-cell exclusive. *Nature medicine*. 2003 Feb;9(2):198-205. PubMed PMID: 12539039.
17. Chamberlain JL, Pittock SJ, Oprescu AM, Dege C, Apiwattanakul M, Kryzer TJ, et al. Peripherin-IgG association with neurologic and endocrine autoimmunity. *Journal of autoimmunity*. 2010 Jun;34(4):469-77. PubMed PMID: 20061119. Pubmed Central PMCID: 2902873.
18. Atkinson MA, Bluestone JA, Eisenbarth GS, Hebrok M, Herold KC, Accili D, et al. How does type 1 diabetes develop?: the notion of homicide or beta-cell suicide revisited. *Diabetes*. 2011 May;60(5):1370-9. PubMed PMID: 21525508. Pubmed Central PMCID: 3292309.
19. Noble JA, Valdes AM, Cook M, Klitz W, Thomson G, Erlich HA. The role of HLA class II genes in insulin-dependent diabetes mellitus: molecular analysis of 180 Caucasian, multiplex families. *American journal of human genetics*. 1996 Nov;59(5):1134-48. PubMed PMID: 8900244. Pubmed Central PMCID: 1914851.
20. Pugliese A, Gianani R, Moromisato R, Awdeh ZL, Alper CA, Erlich HA, et al. HLA-DQB1\*0602 is associated with dominant protection from diabetes even among islet cell antibody-positive first-degree relatives of patients with IDDM. *Diabetes*. 1995 Jun;44(6):608-13. PubMed PMID: 7789622.
21. Nokoff N, Rewers M. Pathogenesis of type 1 diabetes: lessons from natural history studies of high-risk individuals. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2013 Apr;1281:1-15. PubMed PMID: 23360422. Pubmed Central PMCID: 3715099.
22. Palmer JP, Asplin CM, Clemons P, Lyen K, Tatpati O, Raghu PK, et al. Insulin antibodies in insulin-dependent diabetics before insulin treatment. *Science*. 1983 Dec 23;222(4630):1337-9. PubMed PMID: 6362005.
23. Baekkeskov S, Aanstoot HJ, Christgau S, Reetz A, Solimena M, Cascalho M, et al. Identification of the 64K autoantigen in insulin-dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase. *Nature*. 1990 Sep 13;347(6289):151-6. PubMed PMID: 1697648.
24. Hawa M, Rowe R, Lan MS, Notkins AL, Pozzilli P, Christie MR, et al. Value of antibodies to islet protein tyrosine phosphatase-like molecule in predicting type 1 diabetes. *Diabetes*. 1997 Aug;46(8):1270-5. PubMed PMID: 9231650.
25. Kawasaki E, Eisenbarth GS, Wasmeier C, Hutton JC. Autoantibodies to protein tyrosine phosphatase-like proteins in type I diabetes. Overlapping specificities to phogrin and ICA512/IA-2. *Diabetes*. 1996 Oct;45(10):1344-9. PubMed PMID: 8826969.
26. Bonifacio E, Lampasona V, Genovese S, Ferrari M, Bosi E. Identification of protein tyrosine phosphatase-like IA2 (islet cell antigen 512) as the insulin-dependent diabetes-related 37/40K autoantigen and a target of islet-cell

antibodies. *Journal of immunology*. 1995 Dec 1;155(11):5419-26. PubMed PMID: 7594559.

27. Wenzlau JM, Juhl K, Yu L, Moua O, Sarkar SA, Gottlieb P, et al. The cation efflux transporter ZnT8 (Slc30A8) is a major autoantigen in human type 1 diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007 Oct 23;104(43):17040-5. PubMed PMID: 17942684. Pubmed Central PMCID: 2040407.

28. Ryden L, Standl E, Bartnik M, Van den Berghe G, Betteridge J, de Boer MJ, et al. Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases: executive summary. The Task Force on Diabetes and Cardiovascular Diseases of the European Society of Cardiology (ESC) and of the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *European heart journal*. 2007 Jan;28(1):88-136. PubMed PMID: 17220161.

29. Chillaron JJ, Goday A, Pedro-Botet J. [Metabolic syndrome, type 1 diabetes mellitus and insulin resistance]. *Medicina clinica*. 2008 Apr 5;130(12):466-70. PubMed PMID: 18405504. Síndrome metabólico, diabetes mellitus tipo 1 y resistencia a la insulina.

30. Kramer CK, Rodrigues TC, Canani LH, Gross JL, Azevedo MJ. Diabetic retinopathy predicts all-cause mortality and cardiovascular events in both type 1 and 2 diabetes: meta-analysis of observational studies. *Diabetes care*. 2011 May;34(5):1238-44. PubMed PMID: 21525504. Pubmed Central PMCID: 3114518.

31. Fehmman HC, Goke R, Goke B. Cell and molecular biology of the incretin hormones glucagon-like peptide-I and glucose-dependent insulin releasing polypeptide. *Endocrine reviews*. 1995 Jun;16(3):390-410. PubMed PMID: 7671853.

32. Lachin JM, Genuth S, Nathan DM, Zinman B, Rutledge BN, Group DER. Effect of glycemic exposure on the risk of microvascular complications in the diabetes control and complications trial--revisited. *Diabetes*. 2008 Apr;57(4):995-1001. PubMed PMID: 18223010.

33. Tesfaye S, Stevens LK, Stephenson JM, Fuller JH, Plater M, Ionescu-Tirgoviste C, et al. Prevalence of diabetic peripheral neuropathy and its relation to glycaemic control and potential risk factors: the EURODIAB IDDM Complications Study. *Diabetologia*. 1996 Nov;39(11):1377-84. PubMed PMID: 8933008.

34. Chase HP, Garg SK, Marshall G, Berg CL, Harris S, Jackson WE, et al. Cigarette smoking increases the risk of albuminuria among subjects with type I diabetes. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 1991 Feb 6;265(5):614-7. PubMed PMID: 1987411.

35. Mohamed Q, Gillies MC, Wong TY. Management of diabetic retinopathy: a systematic review. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2007 Aug 22;298(8):902-16. PubMed PMID: 17712074.

36. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. *The New England journal of medicine*. 1993 Sep 30;329(14):977-86. PubMed PMID: 8366922.

37. Avignon A, Radauceanu A, Monnier L. Nonfasting plasma glucose is a better marker of diabetic control than fasting plasma glucose in type 2 diabetes. *Diabetes care*. 1997 Dec;20(12):1822-6. PubMed PMID: 9405900.
38. El-Kebbi IM, Ziemer DC, Cook CB, Gallina DL, Barnes CS, Phillips LS. Utility of casual postprandial glucose levels in type 2 diabetes management. *Diabetes care*. 2004 Feb;27(2):335-9. PubMed PMID: 14747210.
39. Hanefeld M, Koehler C, Schaper F, Fuecker K, Henkel E, Temelkova-Kurktschiev T. Postprandial plasma glucose is an independent risk factor for increased carotid intima-media thickness in non-diabetic individuals. *Atherosclerosis*. 1999 May;144(1):229-35. PubMed PMID: 10381296.
40. Temelkova-Kurktschiev TS, Koehler C, Henkel E, Leonhardt W, Fuecker K, Hanefeld M. Postchallenge plasma glucose and glycemic spikes are more strongly associated with atherosclerosis than fasting glucose or HbA1c level. *Diabetes care*. 2000 Dec;23(12):1830-4. PubMed PMID: 11128361.
41. Monnier L, Colette C. Glycemic variability: should we and can we prevent it? *Diabetes care*. 2008 Feb;31 Suppl 2:S150-4. PubMed PMID: 18227477.
42. Fu Z, Gilbert ER, Liu D. Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic Beta-cell dysfunction in diabetes. *Current diabetes reviews*. 2013 Jan 1;9(1):25-53. PubMed PMID: 22974359.
43. Unger RH. Glucagon physiology and pathophysiology. *The New England journal of medicine*. 1971 Aug 19;285(8):443-9. PubMed PMID: 4997492.
44. Muller WA, Faloona GR, Aguilar-Parada E, Unger RH. Abnormal alpha-cell function in diabetes. Response to carbohydrate and protein ingestion. *The New England journal of medicine*. 1970 Jul 16;283(3):109-15. PubMed PMID: 4912452.
45. Linke R, Muenzing W, Tatsch K. Is normal gastric emptying a predictor of normal gastric function? *Nuklearmedizin Nuclear medicine*. 2005;44(3):81-5. PubMed PMID: 15968415.
46. Lipp RW, Schnedl WJ, Hammer HF, Kotanko P, Leb G, Krejs GJ. Evidence of accelerated gastric emptying in longstanding diabetic patients after ingestion of a semisolid meal. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*. 1997 May;38(5):814-8. PubMed PMID: 9170452.
47. Meier M, Linke R, Tatsch K, Standl E, Schnell O. An advanced approach for the assessment of gastric motor function in long-term type 1 diabetes mellitus with and without autonomic neuropathy. *Clinical autonomic research : official journal of the Clinical Autonomic Research Society*. 2002 Jun;12(3):197-202. PubMed PMID: 12269554.
48. Oster-Jorgensen E, Pedersen SA, Larsen ML. The influence of induced hyperglycaemia on gastric emptying rate in healthy humans. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*. 1990 Dec;50(8):831-6. PubMed PMID: 2084820.
49. Fraser RJ, Horowitz M, Maddox AF, Harding PE, Chatterton BE, Dent J. Hyperglycaemia slows gastric emptying in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia*. 1990 Nov;33(11):675-80. PubMed PMID: 2076799.
50. Samsom M, Roelofs JM, Akkermans LM, van Berge Henegouwen GP, Smout AJ. Proximal gastric motor activity in response to a liquid meal in type I diabetes mellitus with autonomic neuropathy. *Digestive diseases and sciences*. 1998 Mar;43(3):491-6. PubMed PMID: 9539642.

51. DeFronzo RA, Hendler R, Simonson D. Insulin resistance is a prominent feature of insulin-dependent diabetes. *Diabetes*. 1982 Sep;31(9):795-801. PubMed PMID: 6761214.
52. DeFronzo RA, Simonson D, Ferrannini E. Hepatic and peripheral insulin resistance: a common feature of type 2 (non-insulin-dependent) and type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia*. 1982 Oct;23(4):313-9. PubMed PMID: 6754515.
53. Yip J, Mattock MB, Morocutti A, Sethi M, Trevisan R, Viberti G. Insulin resistance in insulin-dependent diabetic patients with microalbuminuria. *Lancet*. 1993 Oct 9;342(8876):883-7. PubMed PMID: 8105164.
54. Teupe B, Bergis K. Epidemiological evidence for "double diabetes". *Lancet*. 1991 Feb 9;337(8737):361-2. PubMed PMID: 1671252.
55. Kilpatrick ES, Rigby AS, Atkin SL. Insulin resistance, the metabolic syndrome, and complication risk in type 1 diabetes: "double diabetes" in the Diabetes Control and Complications Trial. *Diabetes care*. 2007 Mar;30(3):707-12. PubMed PMID: 17327345.
56. Chaturvedi N, Sjoelie AK, Porta M, Aldington SJ, Fuller JH, Songini M, et al. Markers of insulin resistance are strong risk factors for retinopathy incidence in type 1 diabetes. *Diabetes care*. 2001 Feb;24(2):284-9. PubMed PMID: 11213880.
57. Orchard TJ, Chang YF, Ferrell RE, Petro N, Ellis DE. Nephropathy in type 1 diabetes: a manifestation of insulin resistance and multiple genetic susceptibilities? Further evidence from the Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complication Study. *Kidney international*. 2002 Sep;62(3):963-70. PubMed PMID: 12164879.
58. Giorgino F, Laviola L, Cavallo Perin P, Solnica B, Fuller J, Chaturvedi N. Factors associated with progression to macroalbuminuria in microalbuminuric Type 1 diabetic patients: the EURODIAB Prospective Complications Study. *Diabetologia*. 2004 Jun;47(6):1020-8. PubMed PMID: 15170497.
59. Tesfaye S, Chaturvedi N, Eaton SE, Ward JD, Manes C, Ionescu-Tirgoviste C, et al. Vascular risk factors and diabetic neuropathy. *The New England journal of medicine*. 2005 Jan 27;352(4):341-50. PubMed PMID: 15673800.
60. de Boer IH, Sibley SD, Kestenbaum B, Sampson JN, Young B, Cleary PA, et al. Central obesity, incident microalbuminuria, and change in creatinine clearance in the epidemiology of diabetes interventions and complications study. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2007 Jan;18(1):235-43. PubMed PMID: 17151331. Pubmed Central PMCID: 2622719.
61. Himsworth HP. Management of Diabetes Mellitus. *British medical journal*. 1936 Jul 18;2(3941):137-41. PubMed PMID: 20779976. Pubmed Central PMCID: 2457250.
62. Orchard TJ, Olson JC, Erbey JR, Williams K, Forrest KY, Smithline Kinder L, et al. Insulin resistance-related factors, but not glycemia, predict coronary artery disease in type 1 diabetes: 10-year follow-up data from the Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study. *Diabetes care*. 2003 May;26(5):1374-9. PubMed PMID: 12716791.

63. Groop PH, Forsblom C, Thomas MC. Mechanisms of disease: Pathway-selective insulin resistance and microvascular complications of diabetes. *Nature clinical practice Endocrinology & metabolism*. 2005 Dec;1(2):100-10. PubMed PMID: 16929378.
64. DeFronzo RA. Insulin resistance, hyperinsulinemia, and coronary artery disease: a complex metabolic web. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 1992;20 Suppl 11:S1-16. PubMed PMID: 1284137.
65. Dabelea D, D'Agostino RB, Jr., Mayer-Davis EJ, Pettitt DJ, Imperatore G, Dolan LM, et al. Testing the accelerator hypothesis: body size, beta-cell function, and age at onset of type 1 (autoimmune) diabetes. *Diabetes care*. 2006 Feb;29(2):290-4. PubMed PMID: 16443875.
66. Bjork E, Kampe O, Karlsson FA, Pipeleers DG, Andersson A, Hellerstrom C, et al. Glucose regulation of the autoantigen GAD65 in human pancreatic islets. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1992 Dec;75(6):1574-6. PubMed PMID: 1464667.
67. Chillaron JJ, Sales MP, Sagarra E, Castells I, Benaiges D, Flores Le-Roux JA, et al. [Chronic complications in type 1 diabetes mellitus. Analysis of a cohort of 291 patients with a mean evolution time of 15 years]. *Revista clinica espanola*. 2012;212(8):375-82. PubMed PMID: 22765958. Complicaciones cronicas en la diabetes mellitus tipo 1. Analisis de una cohorte de 291 pacientes con un tiempo medio de evolucion de 15 anos.
68. Thorn LM, Forsblom C, Fagerudd J, Thomas MC, Pettersson-Fernholm K, Saraheimo M, et al. Metabolic syndrome in type 1 diabetes: association with diabetic nephropathy and glycemic control (the FinnDiane study). *Diabetes care*. 2005 Aug;28(8):2019-24. PubMed PMID: 16043748.
69. McGill M, Molyneaux L, Twigg SM, Yue DK. The metabolic syndrome in type 1 diabetes: does it exist and does it matter? *Journal of diabetes and its complications*. 2008 Jan-Feb;22(1):18-23. PubMed PMID: 18191073.
70. Duvnjak L, Duvnjak M. The metabolic syndrome - an ongoing story. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society*. 2009 Dec;60 Suppl 7:19-24. PubMed PMID: 20388942.
71. Stone NJ, Bilek S, Rosenbaum S. Recent National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III update: adjustments and options. *The American journal of cardiology*. 2005 Aug 22;96(4A):53E-9E. PubMed PMID: 16098845.
72. Ruderman NB, Saha AK, Vavvas D, Kurowski T, Laybutt DR, Schmitz-Peiffer C, et al. Malonyl CoA as a metabolic switch and a regulator of insulin sensitivity. *Advances in experimental medicine and biology*. 1998;441:263-70. PubMed PMID: 9781332.
73. L S-D. Pathophysiology of the Metabolic Syndrome. *MEDICUS*. 2004;13(2):15-25.
74. DeFronzo RA, Tobin JD, Andres R. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *The American journal of physiology*. 1979 Sep;237(3):E214-23. PubMed PMID: 382871.
75. Williams KV, Erbey JR, Becker D, Arslanian S, Orchard TJ. Can clinical factors estimate insulin resistance in type 1 diabetes? *Diabetes*. 2000 Apr;49(4):626-32. PubMed PMID: 10871201.

76. Chillaron JJ, Goday A, Flores-Le-Roux JA, Benaiges D, Carrera MJ, Puig J, et al. Estimated glucose disposal rate in assessment of the metabolic syndrome and microvascular complications in patients with type 1 diabetes. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2009 Sep;94(9):3530-4. PubMed PMID: 19584183.
77. Bayliss WM, Starling EH. The mechanism of pancreatic secretion. *The Journal of physiology*. 1902 Sep 12;28(5):325-53. PubMed PMID: 16992627. Pubmed Central PMCID: 1540572.
78. J LB. Sur les possibilit  s d'un traitement du diab  te par l'insuline. *Bull Acad R Med Belg*. 1932;12:620-34.
79. Stonehouse A, Okerson T, Kendall D, Maggs D. Emerging incretin based therapies for type 2 diabetes: incretin mimetics and DPP-4 inhibitors. *Current diabetes reviews*. 2008 May;4(2):101-9. PubMed PMID: 18473757.
80. Nauck MA, Homberger E, Siegel EG, Allen RC, Eaton RP, Ebert R, et al. Incretin effects of increasing glucose loads in man calculated from venous insulin and C-peptide responses. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1986 Aug;63(2):492-8. PubMed PMID: 3522621.
81. Elrick H, Stimmler L, Hlad CJ, Jr., Arai Y. Plasma Insulin Response to Oral and Intravenous Glucose Administration. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1964 Oct;24:1076-82. PubMed PMID: 14228531.
82. Drucker DJ, Nauck MA. The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. *Lancet*. 2006 Nov 11;368(9548):1696-705. PubMed PMID: 17098089.
83. Holst JJ. The physiology of glucagon-like peptide 1. *Physiol Rev*. 2007 Oct;87(4):1409-39. PubMed PMID: 17928588.
84. Orskov C, Jeppesen J, Madsbad S, Holst JJ. Proglucagon products in plasma of noninsulin-dependent diabetics and nondiabetic controls in the fasting state and after oral glucose and intravenous arginine. *J Clin Invest*. 1991 Feb;87(2):415-23. PubMed PMID: 1991827. Pubmed Central PMCID: 295092.
85. Ross SA, Dupre J. Effects of ingestion of triglyceride or galactose on secretion of gastric inhibitory polypeptide and on responses to intravenous glucose in normal and diabetic subjects. *Diabetes*. 1978 Mar;27(3):327-33. PubMed PMID: 640238.
86. Tolhurst G, Reimann F, Gribble FM. Intestinal sensing of nutrients. *Handb Exp Pharmacol*. 2012 (209):309-35. PubMed PMID: 22249821.
87. Drucker DJ. Glucagon-like peptide-1 and the islet beta-cell: augmentation of cell proliferation and inhibition of apoptosis. *Endocrinology*. 2003 Dec;144(12):5145-8. PubMed PMID: 14645210.
88. Hare KJ, Vilsboll T, Asmar M, Deacon CF, Knop FK, Holst JJ. The glucagonostatic and insulinotropic effects of glucagon-like peptide 1 contribute equally to its glucose-lowering action. *Diabetes*. 2010 Jul;59(7):1765-70. PubMed PMID: 20150286. Pubmed Central PMCID: 2889777.
89. Vilsboll T. On the role of the incretin hormones GIP and GLP-1 in the pathogenesis of Type 2 diabetes mellitus. *Dan Med Bull*. 2004 Nov;51(4):364-70. PubMed PMID: 16009062.

90. Gupta V. Pleiotropic effects of incretins. *Indian journal of endocrinology and metabolism*. 2012 Mar;16 Suppl 1:S47-56. PubMed PMID: 22701844. Pubmed Central PMCID: 3354942.
91. Fehmman HC, Habener JF. Insulinotropic hormone glucagon-like peptide-I(7-37) stimulation of proinsulin gene expression and proinsulin biosynthesis in insulinoma beta TC-1 cells. *Endocrinology*. 1992 Jan;130(1):159-66. PubMed PMID: 1309325.
92. Gromada J, Holst JJ, Rorsman P. Cellular regulation of islet hormone secretion by the incretin hormone glucagon-like peptide 1. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*. 1998 Apr;435(5):583-94. PubMed PMID: 9479010.
93. Kieffer TJ, Habener JF. The glucagon-like peptides. *Endocrine reviews*. 1999 Dec;20(6):876-913. PubMed PMID: 10605628.
94. Ruiz-Grande C, Alarcon C, Alcantara A, Castilla C, Lopez Novoa JM, Villanueva-Penacarrillo ML, et al. Renal catabolism of truncated glucagon-like peptide 1. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme*. 1993 Dec;25(12):612-6. PubMed PMID: 8119664.
95. Deacon CF. What do we know about the secretion and degradation of incretin hormones? *Regulatory peptides*. 2005 Jun 15;128(2):117-24. PubMed PMID: 15780431.
96. Lambeir AM, Durinx C, Scharpe S, De Meester I. Dipeptidyl-peptidase IV from bench to bedside: an update on structural properties, functions, and clinical aspects of the enzyme DPP IV. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*. 2003 Jun;40(3):209-94. PubMed PMID: 12892317.
97. Holst JJ, Deacon CF. Glucagon-like peptide-1 mediates the therapeutic actions of DPP-IV inhibitors. *Diabetologia*. 2005 Apr;48(4):612-5. PubMed PMID: 15759106.
98. Deacon CF, Johnsen AH, Holst JJ. Degradation of glucagon-like peptide-1 by human plasma in vitro yields an N-terminally truncated peptide that is a major endogenous metabolite in vivo. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1995 Mar;80(3):952-7. PubMed PMID: 7883856.
99. Deacon CF, Nauck MA, Meier J, Hucking K, Holst JJ. Degradation of endogenous and exogenous gastric inhibitory polypeptide in healthy and in type 2 diabetic subjects as revealed using a new assay for the intact peptide. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2000 Oct;85(10):3575-81. PubMed PMID: 11061504.
100. Rask E, Olsson T, Soderberg S, Johnson O, Seckl J, Holst JJ, et al. Impaired incretin response after a mixed meal is associated with insulin resistance in nondiabetic men. *Diabetes care*. 2001 Sep;24(9):1640-5. PubMed PMID: 11522713.
101. Ranganathan S, Ciaraldi TP, Henry RR, Mudaliar S, Kern PA. Lack of effect of leptin on glucose transport, lipoprotein lipase, and insulin action in adipose and muscle cells. *Endocrinology*. 1998 May;139(5):2509-13. PubMed PMID: 9564865.
102. Orskov C, Wettergren A, Holst JJ. Secretion of the incretin hormones glucagon-like peptide-1 and gastric inhibitory polypeptide correlates with insulin

secretion in normal man throughout the day. *Scandinavian journal of gastroenterology*. 1996 Jul;31(7):665-70. PubMed PMID: 8819215.

103. Meier JJ, Nauck MA, Kranz D, Holst JJ, Deacon CF, Gaeckler D, et al. Secretion, degradation, and elimination of glucagon-like peptide 1 and gastric inhibitory polypeptide in patients with chronic renal insufficiency and healthy control subjects. *Diabetes*. 2004 Mar;53(3):654-62. PubMed PMID: 14988249.

104. Holst JJ, Knop FK, Vilsboll T, Krarup T, Madsbad S. Loss of incretin effect is a specific, important, and early characteristic of type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2011 May;34 Suppl 2:S251-7. PubMed PMID: 21525464. Pubmed Central PMCID: 3632188.

105. Nauck MA, Vardarli I, Deacon CF, Holst JJ, Meier JJ. Secretion of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) in type 2 diabetes: what is up, what is down? *Diabetologia*. 2011 Jan;54(1):10-8. PubMed PMID: 20871975.

106. Herzberg-Schafer S, Heni M, Stefan N, Haring HU, Fritsche A. Impairment of GLP1-induced insulin secretion: role of genetic background, insulin resistance and hyperglycaemia. *Diabetes, obesity & metabolism*. 2012 Oct;14 Suppl 3:85-90. PubMed PMID: 22928568.

107. Ahren B. Incretin hormones and the up-regulation of insulin secretion in insulin resistance. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2012 Apr;97(4):1173-5. PubMed PMID: 22493308.

108. Yabe D, Seino Y. Incretin actions beyond the pancreas: lessons from knockout mice. *Current opinion in pharmacology*. 2013 Dec;13(6):946-53. PubMed PMID: 24095602.

109. Koliaki C, Doupis J. Incretin-based therapy: a powerful and promising weapon in the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes therapy : research, treatment and education of diabetes and related disorders*. 2011 May;2(2):101-21. PubMed PMID: 22127804. Pubmed Central PMCID: 3144767.

110. Monami M, Cremasco F, Lamanna C, Colombi C, Desideri CM, Iacomelli I, et al. Glucagon-like peptide-1 receptor agonists and cardiovascular events: a meta-analysis of randomized clinical trials. *Exp Diabetes Res*. 2011;2011:215764. PubMed PMID: 21584276. Pubmed Central PMCID: 3092497.

111. Davidson MH. Cardiovascular effects of glucagonlike peptide-1 agonists. *The American journal of cardiology*. 2011 Aug 2;108(3 Suppl):33B-41B. PubMed PMID: 21802579.

112. Viswanathan P, Chaudhuri A, Bhatia R, Al-Atrash F, Mohanty P, Dandona P. Exenatide therapy in obese patients with type 2 diabetes mellitus treated with insulin. *Endocrine practice : official journal of the American College of Endocrinology and the American Association of Clinical Endocrinologists*. 2007 Sep;13(5):444-50. PubMed PMID: 17872344.

113. Zander M, Madsbad S, Madsen JL, Holst JJ. Effect of 6-week course of glucagon-like peptide 1 on glycaemic control, insulin sensitivity, and beta-cell function in type 2 diabetes: a parallel-group study. *Lancet*. 2002 Mar 9;359(9309):824-30. PubMed PMID: 11897280.

114. Tofft-Nielsen MB, Madsbad S, Holst JJ. Continuous subcutaneous infusion of glucagon-like peptide 1 lowers plasma glucose and reduces appetite in type 2 diabetic patients. *Diabetes care*. 1999 Jul;22(7):1137-43. PubMed PMID: 10388979.



115. Puddu A, Mach F, Nencioni A, Viviani GL, Montecucco F. An emerging role of glucagon-like peptide-1 in preventing advanced-glycation-end-product-mediated damages in diabetes. *Mediators of inflammation*. 2013;2013:591056. PubMed PMID: 23365488. Pubmed Central PMCID: 3556837.
116. Bulum T, Smircic-Duvnjak L, Car N, Metelko Z. [Incretins in the treatment of diabetes]. *Lijecnicki vjesnik*. 2008 Jul-Aug;130(7-8):195-200. PubMed PMID: 18979908. Inkretini u liječenju secerne bolesti.
117. Meier JJ, Nauck MA. Is secretion of glucagon-like peptide-1 reduced in type 2 diabetes mellitus? *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*. 2008 Nov;4(11):606-7. PubMed PMID: 18725906.
118. Calanna S, Christensen M, Holst JJ, Laferrere B, Gluud LL, Vilsboll T, et al. Secretion of glucagon-like peptide-1 in patients with type 2 diabetes mellitus: systematic review and meta-analyses of clinical studies. *Diabetologia*. 2013 May;56(5):965-72. PubMed PMID: 23377698. Pubmed Central PMCID: 3687347.
119. Toft-Nielsen MB, Damholt MB, Madsbad S, Hilsted LM, Hughes TE, Michelsen BK, et al. Determinants of the impaired secretion of glucagon-like peptide-1 in type 2 diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001 Aug;86(8):3717-23. PubMed PMID: 11502801.
120. Vilsboll T, Krarup T, Deacon CF, Madsbad S, Holst JJ. Reduced postprandial concentrations of intact biologically active glucagon-like peptide 1 in type 2 diabetic patients. *Diabetes*. 2001 Mar;50(3):609-13. PubMed PMID: 11246881.
121. Muscelli E, Mari A, Casolaro A, Camastra S, Seghieri G, Gastaldelli A, et al. Separate impact of obesity and glucose tolerance on the incretin effect in normal subjects and type 2 diabetic patients. *Diabetes*. 2008 May;57(5):1340-8. PubMed PMID: 18162504.
122. Lim GE, Huang GJ, Flora N, LeRoith D, Rhodes CJ, Brubaker PL. Insulin regulates glucagon-like peptide-1 secretion from the enteroendocrine L cell. *Endocrinology*. 2009 Feb;150(2):580-91. PubMed PMID: 18818290.
123. Xu G, Kaneto H, Laybutt DR, Duvivier-Kali VF, Trivedi N, Suzuma K, et al. Downregulation of GLP-1 and GIP receptor expression by hyperglycemia: possible contribution to impaired incretin effects in diabetes. *Diabetes*. 2007 Jun;56(6):1551-8. PubMed PMID: 17360984.
124. Bagger JI, Knop FK, Lund A, Vestergaard H, Holst JJ, Vilsboll T. Impaired regulation of the incretin effect in patients with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011 Mar;96(3):737-45. PubMed PMID: 21252240.
125. Bose M, Teixeira J, Olivan B, Bawa B, Arias S, Machineni S, et al. Weight loss and incretin responsiveness improve glucose control independently after gastric bypass surgery. *J Diabetes*. 2010 Mar;2(1):47-55. PubMed PMID: 20676394. Pubmed Central PMCID: 2910618.
126. Knop FK, Vilsboll T, Hojberg PV, Larsen S, Madsbad S, Volund A, et al. Reduced incretin effect in type 2 diabetes: cause or consequence of the diabetic state? *Diabetes*. 2007 Aug;56(8):1951-9. PubMed PMID: 17513701.
127. Knop FK, Vilsboll T, Madsbad S, Holst JJ, Krarup T. Inappropriate suppression of glucagon during OGTT but not during isoglycaemic i.v. glucose infusion contributes to the reduced incretin effect in type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia*. 2007 Apr;50(4):797-805. PubMed PMID: 17225124.

128. LaFerrere B, Heshka S, Wang K, Khan Y, McGinty J, Teixeira J, et al. Incretin levels and effect are markedly enhanced 1 month after Roux-en-Y gastric bypass surgery in obese patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2007 Jul;30(7):1709-16. PubMed PMID: 17416796. Pubmed Central PMCID: 2743330.
129. Meier JJ, Nauck MA, Pott A, Heinze K, Goetze O, Bulut K, et al. Glucagon-like peptide 2 stimulates glucagon secretion, enhances lipid absorption, and inhibits gastric acid secretion in humans. *Gastroenterology*. 2006 Jan;130(1):44-54. PubMed PMID: 16401467.
130. Ban K, Noyan-Ashraf MH, Hoefer J, Bolz SS, Drucker DJ, Husain M. Cardioprotective and vasodilatory actions of glucagon-like peptide 1 receptor are mediated through both glucagon-like peptide 1 receptor-dependent and -independent pathways. *Circulation*. 2008 May 6;117(18):2340-50. PubMed PMID: 18427132.
131. Grieve DJ, Cassidy RS, Green BD. Emerging cardiovascular actions of the incretin hormone glucagon-like peptide-1: potential therapeutic benefits beyond glycaemic control? *Br J Pharmacol*. 2009 Aug;157(8):1340-51. PubMed PMID: 19681866. Pubmed Central PMCID: 2765323.
132. Lehrke M, Marx N. Cardiovascular effects of incretin-based therapies. *Rev Diabet Stud*. 2011 Fall;8(3):382-91. PubMed PMID: 22262075. Pubmed Central PMCID: 3280672.
133. Fujishima Y, Maeda N, Inoue K, Kashine S, Nishizawa H, Hirata A, et al. Efficacy of liraglutide, a glucagon-like peptide-1 (GLP-1) analogue, on body weight, eating behavior, and glycemic control, in Japanese obese type 2 diabetes. *Cardiovasc Diabetol*. 2012;11:107. PubMed PMID: 22973968. Pubmed Central PMCID: 3459720.
134. Yamaoka-Tojo M, Tojo T, Takahira N, Matsunaga A, Aoyama N, Masuda T, et al. Elevated circulating levels of an incretin hormone, glucagon-like peptide-1, are associated with metabolic components in high-risk patients with cardiovascular disease. *Cardiovasc Diabetol*. 2010;9:17. PubMed PMID: 20470376. Pubmed Central PMCID: 2891690.
135. Schirra J, Katschinski M, Weidmann C, Schafer T, Wank U, Arnold R, et al. Gastric emptying and release of incretin hormones after glucose ingestion in humans. *J Clin Invest*. 1996 Jan 1;97(1):92-103. PubMed PMID: 8550855. Pubmed Central PMCID: 507066.
136. Piotrowski K, Becker M, Zugwurst J, Biller-Friedmann I, Spoettl G, Greif M, et al. Circulating concentrations of GLP-1 are associated with coronary atherosclerosis in humans. *Cardiovasc Diabetol*. 2013;12(1):117. PubMed PMID: 23953602. Pubmed Central PMCID: 3765863.
137. Lugari R, Dell'Anna C, Ugolotti D, Dei Cas A, Barilli AL, Zandomenighi R, et al. Effect of nutrient ingestion on glucagon-like peptide 1 (7-36 amide) secretion in human type 1 and type 2 diabetes. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme*. 2000 Oct;32(10):424-8. PubMed PMID: 11069208.
138. Vilsboll T, Krarup T, Sonne J, Madsbad S, Volund A, Juul AG, et al. Incretin secretion in relation to meal size and body weight in healthy subjects and people with type 1 and type 2 diabetes mellitus. *The Journal of clinical*

endocrinology and metabolism. 2003 Jun;88(6):2706-13. PubMed PMID: 12788877.

139. Kamoi K, Shinozaki Y, Furukawa K, Sasaki H. Decreased active GLP-1 response following large test meal in patients with type 1 diabetes using bolus insulin analogues. Endocrine journal. 2011;58(10):905-11. PubMed PMID: 21878743.

140. Kielgast U, Krarup T, Holst JJ, Madsbad S. Four weeks of treatment with liraglutide reduces insulin dose without loss of glycemic control in type 1 diabetic patients with and without residual beta-cell function. Diabetes care. 2011 Jul;34(7):1463-8. PubMed PMID: 21593296. Pubmed Central PMCID: 3120168.

141. Porksen S, Nielsen LB, Kaas A, Kocova M, Chiarelli F, Orskov C, et al. Meal-stimulated glucagon release is associated with postprandial blood glucose level and does not interfere with glycemic control in children and adolescents with new-onset type 1 diabetes. The Journal of clinical endocrinology and metabolism. 2007 Aug;92(8):2910-6. PubMed PMID: 17519307.

142. Kaas A, Andersen ML, Fredheim S, Hougaard P, Buschard K, Petersen JS, et al. Proinsulin, GLP-1, and glucagon are associated with partial remission in children and adolescents with newly diagnosed type 1 diabetes. Pediatric diabetes. 2012 Feb;13(1):51-8. PubMed PMID: 22118630.

143. Nauck M, Stockmann F, Ebert R, Creutzfeldt W. Reduced incretin effect in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes. Diabetologia. 1986 Jan;29(1):46-52. PubMed PMID: 3514343.

144. Greenbaum CJ, Prigeon RL, D'Alessio DA. Impaired beta-cell function, incretin effect, and glucagon suppression in patients with type 1 diabetes who have normal fasting glucose. Diabetes. 2002 Apr;51(4):951-7. PubMed PMID: 11916912.

145. Kielgast U, Holst JJ, Madsbad S. Antidiabetic actions of endogenous and exogenous GLP-1 in type 1 diabetic patients with and without residual beta-cell function. Diabetes. 2011 May;60(5):1599-607. PubMed PMID: 21441444. Pubmed Central PMCID: 3292336.

146. Gutniak M, Orskov C, Holst JJ, Ahren B, Efendic S. Antidiabetogenic effect of glucagon-like peptide-1 (7-36)amide in normal subjects and patients with diabetes mellitus. The New England journal of medicine. 1992 May 14;326(20):1316-22. PubMed PMID: 1348845.

147. Creutzfeldt WO, Kleine N, Willms B, Orskov C, Holst JJ, Nauck MA. Glucagonostatic actions and reduction of fasting hyperglycemia by exogenous glucagon-like peptide I(7-36) amide in type I diabetic patients. Diabetes care. 1996 Jun;19(6):580-6. PubMed PMID: 8725855.

148. Dunning BE, Foley JE, Ahren B. Alpha cell function in health and disease: influence of glucagon-like peptide-1. Diabetologia. 2005 Sep;48(9):1700-13. PubMed PMID: 16132964.

149. de Heer J, Rasmussen C, Coy DH, Holst JJ. Glucagon-like peptide-1, but not glucose-dependent insulinotropic peptide, inhibits glucagon secretion via somatostatin (receptor subtype 2) in the perfused rat pancreas. Diabetologia. 2008 Dec;51(12):2263-70. PubMed PMID: 18795252.

150. Ding WG, Renstrom E, Rorsman P, Buschard K, Gromada J. Glucagon-like peptide I and glucose-dependent insulinotropic polypeptide stimulate Ca<sup>2+</sup>-

induced secretion in rat alpha-cells by a protein kinase A-mediated mechanism. *Diabetes*. 1997 May;46(5):792-800. PubMed PMID: 9133546.

151. Heller RS, Kieffer TJ, Habener JF. Insulinotropic glucagon-like peptide I receptor expression in glucagon-producing alpha-cells of the rat endocrine pancreas. *Diabetes*. 1997 May;46(5):785-91. PubMed PMID: 9133545.

152. Moens K, Heimberg H, Flamez D, Huypens P, Quartier E, Ling Z, et al. Expression and functional activity of glucagon, glucagon-like peptide I, and glucose-dependent insulinotropic peptide receptors in rat pancreatic islet cells. *Diabetes*. 1996 Feb;45(2):257-61. PubMed PMID: 8549871.

153. Franklin I, Gromada J, Gjinovci A, Theander S, Wollheim CB. Beta-cell secretory products activate alpha-cell ATP-dependent potassium channels to inhibit glucagon release. *Diabetes*. 2005 Jun;54(6):1808-15. PubMed PMID: 15919803.

154. Fehmann HC, Hering BJ, Wolf MJ, Brandhorst H, Brandhorst D, Bretzel RG, et al. The effects of glucagon-like peptide-I (GLP-I) on hormone secretion from isolated human pancreatic islets. *Pancreas*. 1995 Aug;11(2):196-200. PubMed PMID: 7479679.

155. Creutzfeldt W, Talaulicar M, Ebert R, Willms B. Inhibition of gastric inhibitory polypeptide (GIP) release by insulin and glucose in juvenile diabetes. *Diabetes*. 1980 Feb;29(2):140-5. PubMed PMID: 6986299.

156. Matsuyama T, Hoffman WH, Dunbar JC, Foa NL, Foa PP. Glucose, insulin, pancreatic glucagon and glucagon-like immunoreactive materials in the plasma of normal and diabetic children. Effect of the initial insulin treatment. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme*. 1975 Nov;7(6):452-6. PubMed PMID: 1213649.

157. Akinci A, Aydin O, Ozerol HI. Glucagon-like peptide-1 and-2 levels in children with diabetic ketoacidosis. *Journal of clinical research in pediatric endocrinology*. 2009;1(3):144-50. PubMed PMID: 21274399. Pubmed Central PMCID: 3005645.

158. Ryskjaer J, Deacon CF, Carr RD, Krarup T, Madsbad S, Holst J, et al. Plasma dipeptidyl peptidase-IV activity in patients with type-2 diabetes mellitus correlates positively with HbA1c levels, but is not acutely affected by food intake. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*. 2006 Sep;155(3):485-93. PubMed PMID: 16914604.

159. Shigeto M, Katsura M, Matsuda M, Ohkuma S, Kaku K. Low, but physiological, concentration of GLP-1 stimulates insulin secretion independent of the cAMP-dependent protein kinase pathway. *Journal of pharmacological sciences*. 2008 Nov;108(3):274-9. PubMed PMID: 18987435.

160. Lodefalk M, Carlsson-Skwirut C, Holst JJ, Aman J, Bang P. Effects of fat supplementation on postprandial GIP, GLP-1, ghrelin and IGFBP-1 levels: a pilot study on adolescents with type 1 diabetes. *Hormone research in paediatrics*. 2010;73(5):355-62. PubMed PMID: 20389106.

161. Sheffield CA, Kane MP, Busch RS. Off-label use of exenatide for the management of insulin-resistant type 1 diabetes mellitus in an obese patient with human immunodeficiency virus infection. *Pharmacotherapy*. 2007 Oct;27(10):1449-55. PubMed PMID: 17896900.

162. Paisley AN, Savage MW, Wiles PG. Stabilizing effect of exenatide in a patient with C-peptide-negative diabetes mellitus. *Diabetic medicine : a journal*

of the British Diabetic Association. 2009 Sep;26(9):935-8. PubMed PMID: 19719716.

163. Kuhadiya ND, Malik R, Bellini N, Patterson JL, Traina A, Makdissi A, et al. Liraglutide as Additional Treatment to Insulin in Obese Patients with Type 1 Diabetes Mellitus. *Endocrine practice : official journal of the American College of Endocrinology and the American Association of Clinical Endocrinologists*. 2013 Jun 27;1-16. PubMed PMID: 23807520.

164. Dupre J. Glycaemic effects of incretins in Type 1 diabetes mellitus: a concise review, with emphasis on studies in humans. *Regul Pept*. 2005 Jun 15;128(2):149-57. PubMed PMID: 15780434.

165. Garg SK, Moser EG, Bode BW, Klaff LJ, Hiatt WR, Beatson C, et al. Effect of sitagliptin on post-prandial glucagon and GLP-1 levels in patients with type 1 diabetes: investigator-initiated, double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Endocrine practice : official journal of the American College of Endocrinology and the American Association of Clinical Endocrinologists*. 2013 Jan-Feb;19(1):19-28. PubMed PMID: 23186950.

166. Ishibashi Y, Matsui T, Ojima A, Nishino Y, Nakashima S, Maeda S, et al. Glucagon-like peptide-1 inhibits angiotensin II-induced mesangial cell damage via protein kinase A. *Microvascular research*. 2012 Jun 30. PubMed PMID: 22750392.

167. Yamagishi S, Matsui T. Pleiotropic effects of glucagon-like peptide-1 (GLP-1)-based therapies on vascular complications in diabetes. *Current pharmaceutical design*. 2011 Dec;17(38):4379-85. PubMed PMID: 22204436.

168. Koderia R, Shikata K, Kataoka HU, Takatsuka T, Miyamoto S, Sasaki M, et al. Glucagon-like peptide-1 receptor agonist ameliorates renal injury through its anti-inflammatory action without lowering blood glucose level in a rat model of type 1 diabetes. *Diabetologia*. 2011 Apr;54(4):965-78. PubMed PMID: 21253697.

169. Park CW, Kim HW, Ko SH, Lim JH, Ryu GR, Chung HW, et al. Long-term treatment of glucagon-like peptide-1 analog exendin-4 ameliorates diabetic nephropathy through improving metabolic anomalies in db/db mice. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2007 Apr;18(4):1227-38. PubMed PMID: 17360951.

170. Hattori S. Sitagliptin reduces albuminuria in patients with type 2 diabetes. *Endocrine journal*. 2011;58(1):69-73. PubMed PMID: 21206136.

171. Kim Chung le T, Hosaka T, Yoshida M, Harada N, Sakaue H, Sakai T, et al. Exendin-4, a GLP-1 receptor agonist, directly induces adiponectin expression through protein kinase A pathway and prevents inflammatory adipokine expression. *Biochemical and biophysical research communications*. 2009 Dec 18;390(3):613-8. PubMed PMID: 19850014.

172. Kazakos KA, Sarafidis PA, Yovos JG. The impact of diabetic autonomic neuropathy on the incretin effect. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*. 2008 Apr;14(4):CR213-20. PubMed PMID: 18376350.

173. Fu Z, Kuang HY, Hao M, Gao XY, Liu Y, Shao N. Protection of exenatide for retinal ganglion cells with different glucose concentrations. *Peptides*. 2012 Sep;37(1):25-31. PubMed PMID: 22727809.

174. Zhang Y, Zhang J, Wang Q, Lei X, Chu Q, Xu GT, et al. Intravitreal injection of exendin-4 analogue protects retinal cells in early diabetic rats. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2011 Jan;52(1):278-85. PubMed PMID: 20688733.
175. Hari Kumar KV, Shaikh A, Prusty P. Addition of exenatide or sitagliptin to insulin in new onset type 1 diabetes: a randomized, open label study. *Diabetes research and clinical practice*. 2013 May;100(2):e55-8. PubMed PMID: 23490599.
176. Ceriello A, Novials A, Ortega E, Canivell S, La Sala L, Pujadas G, et al. Glucagon-like peptide 1 reduces endothelial dysfunction, inflammation, and oxidative stress induced by both hyperglycemia and hypoglycemia in type 1 diabetes. *Diabetes care*. 2013 Aug;36(8):2346-50. PubMed PMID: 23564922. Pubmed Central PMCID: 3714509.
177. Beenken A, Mohammadi M. The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. *Nature reviews Drug discovery*. 2009 Mar;8(3):235-53. PubMed PMID: 19247306.
178. Itoh N, Ornitz DM. Functional evolutionary history of the mouse Fgf gene family. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*. 2008 Jan;237(1):18-27. PubMed PMID: 18058912.
179. Long YC, Kharitonov A. Hormone-like fibroblast growth factors and metabolic regulation. *Biochimica et biophysica acta*. 2011 Jul;1812(7):791-5. PubMed PMID: 21504790.
180. Kuro-o M. Endocrine FGFs and Klothos: emerging concepts. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2008 Sep;19(7):239-45. PubMed PMID: 18692401.
181. Kurosu H, Kuro OM. The Klotho gene family as a regulator of endocrine fibroblast growth factors. *Molecular and cellular endocrinology*. 2009 Feb 5;299(1):72-8. PubMed PMID: 19063940.
182. Nicholes K, Guillet S, Tomlinson E, Hillan K, Wright B, Frantz GD, et al. A mouse model of hepatocellular carcinoma: ectopic expression of fibroblast growth factor 19 in skeletal muscle of transgenic mice. *The American journal of pathology*. 2002 Jun;160(6):2295-307. PubMed PMID: 12057932. Pubmed Central PMCID: 1850847.
183. Nishimura T, Nakatake Y, Konishi M, Itoh N. Identification of a novel FGF, FGF-21, preferentially expressed in the liver. *Biochimica et biophysica acta*. 2000 Jun 21;1492(1):203-6. PubMed PMID: 10858549.
184. Kharitonov A, Shiyanova TL, Koester A, Ford AM, Micanovic R, Galbreath EJ, et al. FGF-21 as a novel metabolic regulator. *The Journal of clinical investigation*. 2005 Jun;115(6):1627-35. PubMed PMID: 15902306. Pubmed Central PMCID: 1088017.
185. Kharitonov A, Dunbar JD, Bina HA, Bright S, Moyers JS, Zhang C, et al. FGF-21/FGF-21 receptor interaction and activation is determined by betaKlotho. *Journal of cellular physiology*. 2008 Apr;215(1):1-7. PubMed PMID: 18064602.
186. Mraz M, Bartlova M, Lacinova Z, Michalsky D, Kasalicky M, Haluzikova D, et al. Serum concentrations and tissue expression of a novel endocrine regulator fibroblast growth factor-21 in patients with type 2 diabetes and obesity. *Clinical endocrinology*. 2009 Sep;71(3):369-75. PubMed PMID: 19702724.

187. Hojman P, Pedersen M, Nielsen AR, Krogh-Madsen R, Yfanti C, Akerstrom T, et al. Fibroblast growth factor-21 is induced in human skeletal muscles by hyperinsulinemia. *Diabetes*. 2009 Dec;58(12):2797-801. PubMed PMID: 19720803. Pubmed Central PMCID: 2780875.
188. Iglesias P, Selgas R, Romero S, Diez JJ. Biological Role, Clinical Significance and Therapeutic Possibilities of the Recently Discovered Metabolic Hormone Fibroblastic Growth Factor 21. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*. 2012 Jun 27. PubMed PMID: 22740503.
189. Tomiyama K, Maeda R, Urakawa I, Yamazaki Y, Tanaka T, Ito S, et al. Relevant use of Klotho in FGF19 subfamily signaling system in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010 Jan 26;107(4):1666-71. PubMed PMID: 20080590. Pubmed Central PMCID: 2824417.
190. Uebanso T, Taketani Y, Yamamoto H, Amo K, Ominami H, Arai H, et al. Paradoxical regulation of human FGF21 by both fasting and feeding signals: is FGF21 a nutritional adaptation factor? *PloS one*. 2011;6(8):e22976. PubMed PMID: 21829679. Pubmed Central PMCID: 3148241.
191. Wang H, Qiang L, Farmer SR. Identification of a domain within peroxisome proliferator-activated receptor gamma regulating expression of a group of genes containing fibroblast growth factor 21 that are selectively repressed by SIRT1 in adipocytes. *Molecular and cellular biology*. 2008 Jan;28(1):188-200. PubMed PMID: 17954559. Pubmed Central PMCID: 2223282.
192. Badman MK, Pissios P, Kennedy AR, Koukos G, Flier JS, Maratos-Flier E. Hepatic fibroblast growth factor 21 is regulated by PPARalpha and is a key mediator of hepatic lipid metabolism in ketotic states. *Cell metabolism*. 2007 Jun;5(6):426-37. PubMed PMID: 17550778.
193. Inagaki T, Dutchak P, Zhao G, Ding X, Gautron L, Parameswara V, et al. Endocrine regulation of the fasting response by PPARalpha-mediated induction of fibroblast growth factor 21. *Cell metabolism*. 2007 Jun;5(6):415-25. PubMed PMID: 17550777.
194. Chau MD, Gao J, Yang Q, Wu Z, Gromada J. Fibroblast growth factor 21 regulates energy metabolism by activating the AMPK-SIRT1-PGC-1alpha pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010 Jul 13;107(28):12553-8. PubMed PMID: 20616029. Pubmed Central PMCID: 2906565.
195. Wente W, Efanov AM, Brenner M, Kharitonov A, Koster A, Sandusky GE, et al. Fibroblast growth factor-21 improves pancreatic beta-cell function and survival by activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and Akt signaling pathways. *Diabetes*. 2006 Sep;55(9):2470-8. PubMed PMID: 16936195.
196. Johnson CL, Weston JY, Chadi SA, Fazio EN, Huff MW, Kharitonov A, et al. Fibroblast growth factor 21 reduces the severity of cerulein-induced pancreatitis in mice. *Gastroenterology*. 2009 Nov;137(5):1795-804. PubMed PMID: 19664632.

197. Izumiya Y, Bina HA, Ouchi N, Akasaki Y, Kharitonov A, Walsh K. FGF21 is an Akt-regulated myokine. *FEBS letters*. 2008 Nov 12;582(27):3805-10. PubMed PMID: 18948104. Pubmed Central PMCID: 2604129.
198. Dutchak PA, Katafuchi T, Bookout AL, Choi JH, Yu RT, Mangelsdorf DJ, et al. Fibroblast growth factor-21 regulates PPARgamma activity and the antidiabetic actions of thiazolidinediones. *Cell*. 2012 Feb 3;148(3):556-67. PubMed PMID: 22304921. Pubmed Central PMCID: 3273727.
199. Potthoff MJ, Inagaki T, Satapati S, Ding X, He T, Goetz R, et al. FGF21 induces PGC-1alpha and regulates carbohydrate and fatty acid metabolism during the adaptive starvation response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009 Jun 30;106(26):10853-8. PubMed PMID: 19541642. Pubmed Central PMCID: 2705613.
200. Semba RD, Sun K, Egan JM, Crasto C, Carlson OD, Ferrucci L. Relationship of serum fibroblast growth factor 21 with abnormal glucose metabolism and insulin resistance: the Baltimore Longitudinal Study of Aging. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2012 Apr;97(4):1375-82. PubMed PMID: 22344195. Pubmed Central PMCID: 3319186.
201. Jian WX, Peng WH, Jin J, Chen XR, Fang WJ, Wang WX, et al. Association between serum fibroblast growth factor 21 and diabetic nephropathy. *Metabolism: clinical and experimental*. 2012 Jun;61(6):853-9. PubMed PMID: 22136913.
202. Galman C, Lundasen T, Kharitonov A, Bina HA, Eriksson M, Hafstrom I, et al. The circulating metabolic regulator FGF21 is induced by prolonged fasting and PPARalpha activation in man. *Cell metabolism*. 2008 Aug;8(2):169-74. PubMed PMID: 18680716.
203. Shen Y, Ma X, Zhou J, Pan X, Hao Y, Zhou M, et al. Additive relationship between serum fibroblast growth factor 21 level and coronary artery disease. *Cardiovascular diabetology*. 2013;12(1):124. PubMed PMID: 23981342. Pubmed Central PMCID: 3766150.
204. Heilbronn LK, Campbell LV, Xu A, Samocha-Bonet D. Metabolically protective cytokines adiponectin and fibroblast growth factor-21 are increased by acute overfeeding in healthy humans. *PloS one*. 2013;8(10):e78864. PubMed PMID: 24205333. Pubmed Central PMCID: 3799638.
205. Bisgaard A, Sorensen K, Johannsen TH, Helge JW, Andersson AM, Juul A. Significant gender difference in serum levels of fibroblast growth factor 21 in Danish children and adolescents. *International journal of pediatric endocrinology*. 2014;2014(1):7. PubMed PMID: 24883065. Pubmed Central PMCID: 4039053.
206. Lee SA, Jeong E, Kim EH, Shin MS, Hwang JY, Koh EH, et al. Various oscillation patterns of serum fibroblast growth factor 21 concentrations in healthy volunteers. *Diabetes & metabolism journal*. 2012 Feb;36(1):29-36. PubMed PMID: 22363919. Pubmed Central PMCID: 3283824.
207. Yu H, Xia F, Lam KS, Wang Y, Bao Y, Zhang J, et al. Circadian rhythm of circulating fibroblast growth factor 21 is related to diurnal changes in fatty acids in humans. *Clinical chemistry*. 2011 May;57(5):691-700. PubMed PMID: 21325103.
208. Arner P, Pettersson A, Mitchell PJ, Dunbar JD, Kharitonov A, Ryden M. FGF21 attenuates lipolysis in human adipocytes - a possible link to improved



insulin sensitivity. *FEBS letters*. 2008 May 28;582(12):1725-30. PubMed PMID: 18460341.

209. Chen WW, Li L, Yang GY, Li K, Qi XY, Zhu W, et al. Circulating FGF-21 levels in normal subjects and in newly diagnose patients with Type 2 diabetes mellitus. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association*. 2008 Jan;116(1):65-8. PubMed PMID: 17926232.

210. Chavez AO, Molina-Carrion M, Abdul-Ghani MA, Folli F, DeFronzo RA, Tripathy D. Circulating fibroblast growth factor-21 is elevated in impaired glucose tolerance and type 2 diabetes and correlates with muscle and hepatic insulin resistance. *Diabetes care*. 2009 Aug;32(8):1542-6. PubMed PMID: 19487637. Pubmed Central PMCID: 2713625.

211. An SY, Lee MS, Yi SA, Ha ES, Han SJ, Kim HJ, et al. Serum fibroblast growth factor 21 was elevated in subjects with type 2 diabetes mellitus and was associated with the presence of carotid artery plaques. *Diabetes research and clinical practice*. 2012 May;96(2):196-203. PubMed PMID: 22293928.

212. Mashili FL, Austin RL, Deshmukh AS, Fritz T, Caidahl K, Bergdahl K, et al. Direct effects of FGF21 on glucose uptake in human skeletal muscle: implications for type 2 diabetes and obesity. *Diabetes/metabolism research and reviews*. 2011 Mar;27(3):286-97. PubMed PMID: 21309058.

213. Reinehr T, Woelfle J, Wunsch R, Roth CL. Fibroblast growth factor 21 (FGF-21) and its relation to obesity, metabolic syndrome, and nonalcoholic fatty liver in children: a longitudinal analysis. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2012 Jun;97(6):2143-50. PubMed PMID: 22438225.

214. Hale C, Chen MM, Stanislaus S, Chinookoswong N, Hager T, Wang M, et al. Lack of overt FGF21 resistance in two mouse models of obesity and insulin resistance. *Endocrinology*. 2012 Jan;153(1):69-80. PubMed PMID: 22067317.

215. Murata Y, Konishi M, Itoh N. FGF21 as an Endocrine Regulator in Lipid Metabolism: From Molecular Evolution to Physiology and Pathophysiology. *Journal of nutrition and metabolism*. 2011;2011:981315. PubMed PMID: 21331285. Pubmed Central PMCID: 3038562.

216. Fisher FM, Chui PC, Antonellis PJ, Bina HA, Kharitonov A, Flier JS, et al. Obesity is a fibroblast growth factor 21 (FGF21)-resistant state. *Diabetes*. 2010 Nov;59(11):2781-9. PubMed PMID: 20682689. Pubmed Central PMCID: 2963536.

217. Zhang X, Yeung DC, Karpisek M, Stejskal D, Zhou ZG, Liu F, et al. Serum FGF21 levels are increased in obesity and are independently associated with the metabolic syndrome in humans. *Diabetes*. 2008 May;57(5):1246-53. PubMed PMID: 18252893.

218. Do HT, Tselykh TV, Makela J, Ho TH, Olkkonen VM, Bornhauser BC, et al. Fibroblast growth factor-21 (FGF21) regulates low-density lipoprotein receptor (LDLR) levels in cells via the E3-ubiquitin ligase Mylip/Idol and the Canopy2 (Cnpy2)/Mylip-interacting saposin-like protein (Msap). *The Journal of biological chemistry*. 2012 Apr 13;287(16):12602-11. PubMed PMID: 22378787. Pubmed Central PMCID: 3339997.

219. Alisi A, Ceccarelli S, Panera N, Prono F, Petrini S, De Stefanis C, et al. Association between Serum Atypical Fibroblast Growth Factors 21 and 19 and

- Pediatric Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *PloS one*. 2013;8(6):e67160. PubMed PMID: 23840612. Pubmed Central PMCID: 3694051.
220. Chartoumpekis DV, Ziros PG, Psyrogiannis AI, Papavassiliou AG, Kyriazopoulou VE, Sykiotis GP, et al. Nrf2 represses FGF21 during long-term high-fat diet-induced obesity in mice. *Diabetes*. 2011 Oct;60(10):2465-73. PubMed PMID: 21852674. Pubmed Central PMCID: 3178292.
221. Diaz-Delfin J, Hondares E, Iglesias R, Giralt M, Caelles C, Villarroja F. TNF-alpha represses beta-Klotho expression and impairs FGF21 action in adipose cells: involvement of JNK1 in the FGF21 pathway. *Endocrinology*. 2012 Sep;153(9):4238-45. PubMed PMID: 22778214.
222. Dushay J, Chui PC, Gopalakrishnan GS, Varela-Rey M, Crawley M, Fisher FM, et al. Increased fibroblast growth factor 21 in obesity and nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*. 2010 Aug;139(2):456-63. PubMed PMID: 20451522.
223. Tan BK, Hallschmid M, Adya R, Kern W, Lehnert H, Randeve HS. Fibroblast growth factor 21 (FGF21) in human cerebrospinal fluid: relationship with plasma FGF21 and body adiposity. *Diabetes*. 2011 Nov;60(11):2758-62. PubMed PMID: 21926274. Pubmed Central PMCID: 3198100.
224. Cuevas-Ramos D, Almeda-Valdes P, Gomez-Perez FJ, Meza-Arana CE, Cruz-Bautista I, Arellano-Campos O, et al. Daily physical activity, fasting glucose, uric acid, and body mass index are independent factors associated with serum fibroblast growth factor 21 levels. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*. 2010 Sep;163(3):469-77. PubMed PMID: 20566587.
225. Mai K, Schwarz F, Bobbert T, Andres J, Assmann A, Pfeiffer AF, et al. Relation between fibroblast growth factor-21, adiposity, metabolism, and weight reduction. *Metabolism: clinical and experimental*. 2011 Feb;60(2):306-11. PubMed PMID: 20362303.
226. Woelnerhanssen B, Peterli R, Steinert RE, Peters T, Borbely Y, Beglinger C. Effects of postbariatric surgery weight loss on adipokines and metabolic parameters: comparison of laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass and laparoscopic sleeve gastrectomy--a prospective randomized trial. *Surgery for obesity and related diseases : official journal of the American Society for Bariatric Surgery*. 2011 Sep-Oct;7(5):561-8. PubMed PMID: 21429816.
227. Lin Z, Wu Z, Yin X, Liu Y, Yan X, Lin S, et al. Serum levels of FGF-21 are increased in coronary heart disease patients and are independently associated with adverse lipid profile. *PloS one*. 2010;5(12):e15534. PubMed PMID: 21206918. Pubmed Central PMCID: 3012070.
228. Lu Y, Liu JH, Zhang LK, Du J, Zeng XJ, Hao G, et al. Fibroblast growth factor 21 as a possible endogenous factor inhibits apoptosis in cardiac endothelial cells. *Chinese medical journal*. 2010 Dec;123(23):3417-21. PubMed PMID: 22166524.
229. Coskun T, Bina HA, Schneider MA, Dunbar JD, Hu CC, Chen Y, et al. Fibroblast growth factor 21 corrects obesity in mice. *Endocrinology*. 2008 Dec;149(12):6018-27. PubMed PMID: 18687777.
230. Xu J, Lloyd DJ, Hale C, Stanislaus S, Chen M, Sivits G, et al. Fibroblast growth factor 21 reverses hepatic steatosis, increases energy expenditure, and

- improves insulin sensitivity in diet-induced obese mice. *Diabetes*. 2009 Jan;58(1):250-9. PubMed PMID: 18840786. Pubmed Central PMCID: 2606881.
231. Cheng X, Zhu B, Jiang F, Fan H. Serum FGF-21 levels in type 2 diabetic patients. *Endocrine research*. 2011;36(4):142-8. PubMed PMID: 21973233.
232. Li K, Li L, Yang M, Zong H, Liu H, Yang G. Effects of rosiglitazone on fasting plasma fibroblast growth factor-21 levels in patients with type 2 diabetes mellitus. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*. 2009 Sep;161(3):391-5. PubMed PMID: 19528204.
233. Samson SL, Sathyanarayana P, Jogi M, Gonzalez EV, Gutierrez A, Krishnamurthy R, et al. Exenatide decreases hepatic fibroblast growth factor 21 resistance in non-alcoholic fatty liver disease in a mouse model of obesity and in a randomised controlled trial. *Diabetologia*. 2011 Dec;54(12):3093-100. PubMed PMID: 21956711.
234. Yang M, Dong J, Liu H, Li L, Yang G. Effects of short-term continuous subcutaneous insulin infusion on fasting plasma fibroblast growth factor-21 levels in patients with newly diagnosed type 2 diabetes mellitus. *PloS one*. 2011;6(10):e26359. PubMed PMID: 22046277. Pubmed Central PMCID: 3202531.
235. Lenart-Lipinska M, Matyjaszek-Matuszek B, Gernand W, Nowakowski A, Solski J. Serum fibroblast growth factor 21 is predictive of combined cardiovascular morbidity and mortality in patients with type 2 diabetes at a relatively short-term follow-up. *Diabetes research and clinical practice*. 2013 Aug;101(2):194-200. PubMed PMID: 23768789.
236. Matuszek B, Lenart-Lipinska M, Duma D, Solski J, Nowakowski A. Evaluation of concentrations of FGF-21 - a new adipocytokine in type 2 diabetes. *Endokrynologia Polska*. 2010 Jan-Feb;61(1):50-4. PubMed PMID: 20205104.
237. Stepan H, Kley K, Hindricks J, Kralisch S, Jank A, Schaarschmidt W, et al. Serum levels of the adipokine fibroblast growth factor-21 are increased in preeclampsia. *Cytokine*. 2013 May;62(2):322-6. PubMed PMID: 23545215.
238. Yang M, Zhang L, Wang C, Liu H, Boden G, Yang G, et al. Liraglutide increases FGF-21 activity and insulin sensitivity in high fat diet and adiponectin knockdown induced insulin resistance. *PloS one*. 2012;7(11):e48392. PubMed PMID: 23152772. Pubmed Central PMCID: 3495944.
239. Zhang J, Li Y. Fibroblast growth factor 21, the endocrine FGF pathway and novel treatments for metabolic syndrome. *Drug discovery today*. 2013 Nov 1. PubMed PMID: 24189035.
240. Xiao Y, Xu A, Law LS, Chen C, Li H, Li X, et al. Distinct changes in serum fibroblast growth factor 21 levels in different subtypes of diabetes. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2012 Jan;97(1):E54-8. PubMed PMID: 22013098.
241. Mai K, Andres J, Biedasek K, Weicht J, Bobbert T, Sabath M, et al. Free fatty acids link metabolism and regulation of the insulin-sensitizing fibroblast growth factor-21. *Diabetes*. 2009 Jul;58(7):1532-8. PubMed PMID: 19401423. Pubmed Central PMCID: 2699854.
242. Mai K, Bobbert T, Groth C, Assmann A, Meinus S, Kraatz J, et al. Physiological modulation of circulating FGF21: relevance of free fatty acids and

- insulin. American journal of physiology Endocrinology and metabolism. 2010 Jul;299(1):E126-30. PubMed PMID: 20424140.
243. Arafat AM, Kaczmarek P, Skrzypski M, Pruszyńska-Oszmala E, Kolodziejski P, Szczepankiewicz D, et al. Glucagon increases circulating fibroblast growth factor 21 independently of endogenous insulin levels: a novel mechanism of glucagon-stimulated lipolysis? Diabetologia. 2013 Mar;56(3):588-97. PubMed PMID: 23262585.
244. Stein S, Bachmann A, Lossner U, Kratzsch J, Bluher M, Stumvoll M, et al. Serum levels of the adipokine FGF21 depend on renal function. Diabetes care. 2009 Jan;32(1):126-8. PubMed PMID: 18840768. Pubmed Central PMCID: 2606845.
245. Han SH, Choi SH, Cho BJ, Lee Y, Lim S, Park YJ, et al. Serum fibroblast growth factor-21 concentration is associated with residual renal function and insulin resistance in end-stage renal disease patients receiving long-term peritoneal dialysis. Metabolism: clinical and experimental. 2010 Nov;59(11):1656-62. PubMed PMID: 20423749.
246. Lin Z, Zhou Z, Liu Y, Gong Q, Yan X, Xiao J, et al. Circulating FGF21 levels are progressively increased from the early to end stages of chronic kidney diseases and are associated with renal function in Chinese. PloS one. 2011;6(4):e18398. PubMed PMID: 21525989. Pubmed Central PMCID: 3078122.
247. Crasto C, Semba RD, Sun K, Ferrucci L. Serum fibroblast growth factor 21 is associated with renal function and chronic kidney disease in community-dwelling adults. Journal of the American Geriatrics Society. 2012 Apr;60(4):792-3. PubMed PMID: 22494291. Pubmed Central PMCID: 3325515.
248. Tuomilehto J, Borch-Johnsen K, Molarius A, Forsen T, Rastenyte D, Sarti C, et al. Incidence of cardiovascular disease in Type 1 (insulin-dependent) diabetic subjects with and without diabetic nephropathy in Finland. Diabetologia. 1998 Jul;41(7):784-90. PubMed PMID: 9686919.
249. World Health Organization G, Department of Noncommunicable Disease Surveillance. Definition, diagnosis and classification of diabetes and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. 1999.
250. Viberti GC, Hill RD, Jarrett RJ, Argyropoulos A, Mahmud U, Keen H. Microalbuminuria as a predictor of clinical nephropathy in insulin-dependent diabetes mellitus. Lancet. 1982 Jun 26;1(8287):1430-2. PubMed PMID: 6123720.
251. Parving HH, Oxenboll B, Svendsen PA, Christiansen JS, Andersen AR. Early detection of patients at risk of developing diabetic nephropathy. A longitudinal study of urinary albumin excretion. Acta endocrinologica. 1982 Aug;100(4):550-5. PubMed PMID: 6812342.
252. Mogensen CE, Christensen CK. Predicting diabetic nephropathy in insulin-dependent patients. The New England journal of medicine. 1984 Jul 12;311(2):89-93. PubMed PMID: 6738599.
253. Perkins BA, Krolewski AS. Early nephropathy in type 1 diabetes: the importance of early renal function decline. Current opinion in nephrology and hypertension. 2009 May;18(3):233-40. PubMed PMID: 19300247. Pubmed Central PMCID: 2830878.

254. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, Zhang YL, Castro AF, 3rd, Feldman HI, et al. A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Annals of internal medicine*. 2009 May 5;150(9):604-12. PubMed PMID: 19414839. Pubmed Central PMCID: 2763564.
255. Bujger Z PJ, Lukenda A, Petriček I Standardizacija optotipa. *Liječ Vjesn*. 2010;132:252-6.
256. Čelić M DV. Dijagnostika ambliopije; U: Čelić M, Dorn V (ed.) *Strabizam i nistagmus*. Medicinska naklada. 2004:278-81
257. society Eg. Patient examination: Intraocular pressure (IOP). U: *Terminology and guidelines for glaucoma*. Editrice Dogma Srl. 2008:61-6.
258. TR F. Examination of the retina: ophthalmoscopy and fundus biomicroscopy. U: Albert DM, Jakobiec FA (ed.) *Principles and practice of ophthalmology*. . Saunders. 2000:1820-30.
259. Aldington SJ, Kohner EM, Meuer S, Klein R, Sjolie AK. Methodology for retinal photography and assessment of diabetic retinopathy: the EURODIAB IDDM complications study. *Diabetologia*. 1995 Apr;38(4):437-44. PubMed PMID: 7796984.
260. Aldington SJ KE, Meuer S, Klein R, Sjolie AK Methodology for retinal photography and assessment of diabetic retinopathy: the EURODIAB IDDM Complications Study. *Diabetologia*. 1995;38:437-44.
261. Taylor BV DP. Clasification of the diabetic neuropathies. U: Dyck PJ, Thomas PK (ed.) *Diabetic neuropathy* 2nd edn. WBSunders Company. 1999:407-14.
262. Association AD. Consensus statement: standardized measures in diabetic neuropathy. *Diabetes Care* 1995;18 (Suppl 1):59-82.
263. Varanasi A, Bellini N, Rawal D, Vora M, Makdissi A, Dhindsa S, et al. Liraglutide as additional treatment for type 1 diabetes. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*. 2011 Jul;165(1):77-84. PubMed PMID: 21646283.
264. Monami M, Dicembrini I, Nardini C, Fiordelli I, Mannucci E. Effects of glucagon-like peptide-1 receptor agonists on cardiovascular risk: a meta-analysis of randomized clinical trials. *Diabetes, obesity & metabolism*. 2013 Jul 6. PubMed PMID: 23829656.
265. Hermansen K, Baekdal TA, Durrig M, Pietraszek A, Mortensen LS, Jorgensen H, et al. Liraglutide suppresses postprandial triglyceride and apolipoprotein B48 elevations after a fat-rich meal in patients with type 2 diabetes: a randomized, double-blind, placebo-controlled, cross-over trial. *Diabetes, obesity & metabolism*. 2013 Nov;15(11):1040-8. PubMed PMID: 23683069.
266. Ponzani P. Long-term effectiveness and safety of liraglutide in clinical practice. *Minerva endocrinologica*. 2013 Mar;38(1):103-12. PubMed PMID: 23435446.
267. Meier JJ, Gethmann A, Gotze O, Gallwitz B, Holst JJ, Schmidt WE, et al. Glucagon-like peptide 1 abolishes the postprandial rise in triglyceride concentrations and lowers levels of non-esterified fatty acids in humans. *Diabetologia*. 2006 Mar;49(3):452-8. PubMed PMID: 16447057.
268. Fujita H, Morii T, Fujishima H, Sato T, Shimizu T, Hosoba M, et al. The protective roles of GLP-1R signaling in diabetic nephropathy: possible

mechanism and therapeutic potential. *Kidney international*. 2013 Oct 23. PubMed PMID: 24152968.

269. Filippatos TD, Elisaf MS. Effects of glucagon-like peptide-1 receptor agonists on renal function. *World journal of diabetes*. 2013 Oct 15;4(5):190-201. PubMed PMID: 24147203. Pubmed Central PMCID: 3797884.

270. Adam TC, Westerterp-Plantenga MS. Nutrient-stimulated GLP-1 release in normal-weight men and women. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme*. 2005 Feb;37(2):111-7. PubMed PMID: 15778929.

271. Kielgast U, Asmar M, Madsbad S, Holst JJ. Effect of glucagon-like peptide-1 on alpha- and beta-cell function in C-peptide-negative type 1 diabetic patients. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2010 May;95(5):2492-6. PubMed PMID: 20207828.

## 11. ŽIVOTOPIS

Karin Zibar rođena je 13.2.1985. godine u Osijeku. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisala je 2002., a diplomirala u ljeto 2008. s odličnim uspjehom. 2004. je dobitnica Državne stipendije, a 2007./2008. Sveučilišne stipendije Grada Zagreba. Bila je demonstrator na Katedri za kemiju i biokemiju od 2003.-2008. Odradila je pripravnički staž u Kliničkoj bolnici Merkur te položila državni ispit. Od 2009. godine je polaznica doktorskog poslijediplomskog znanstvenog studija Biomedicina i zdravstvo na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Od 2009.-2011. je radila kao znanstveni novak na Katedri za pedijatriju Kliničkog bolničkog centra Zagreb na projektu Nasljedne metaboličke i ostale monogenske bolesti djece, pod mentorstvom prof. dr. sc. Ive Barića. 2011. dobila je stipendiju Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa „Jedinstvo uz pomoć znanja“ pod nazivom projekta „Gaining knowledge on newborn screening using tandem mass spectrometry“ te je boravila 3 mjeseca u Mayo Klinici u Rochesteru. Od 2012. je zaposlena kao specijalizantica endokrinologije i dijabetologije u Kliničkoj bolnici Merkur. Od tada sudjeluje u istraživanju patofiziologije šećerne bolesti tipa 1 pod mentorstvom prof. dr. sc. Lee Smirčić-Duvnjak, u sklopu projekta „Metabolički sindrom u šećernoj bolesti tipa 1“. Autorica i koautorica je znanstvenih radova od koji je 13 objavljeno u časopisima indeksiranim u bazi Current Contents.